

ORSAY

Série A

N° d'Ordre ;

674

Paris 1970

RECHERCHES SUR DIVERSES MANIFESTATIONS DE LA RESISTANCE A LA SECHERESSE CHEZ LES COTONNIERS.

Article principal

LA VARIATION DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles
enregistrée au C.N.R.S. sous le Numéro A.O. 4685

par

Jorge Bravo VIEIRA DA SILVA

soutenue le 8 juillet 1970 à la Faculté des Sciences d'Orsay
devant le jury :

MM. LEMEE : Président

LIORET

HELLER

} Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549001_0006

Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre *Gossypium*

II. — La variation de quelques activités enzymatiques ⁽¹⁾

Jorge Bravo VIEIRA-da-SILVA ⁽²⁾

Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé, B.P. 20 - Abidjan
République de Côte d'Ivoire

(Manuscrit reçu le 20 avril 1970)

RÉSUMÉ

On a étudié l'action de la sécheresse induite par un traitement osmotique ou par le dessèchement du sol, sur l'activité de la catalase, de la phosphatase acide, de la ribonucléase, de l'invertase et de l' α et β amylases.

Il a été possible de déterminer l'augmentation de l'activité enzymatique qui est le résultat d'une part de la solubilisation de l'enzyme contenue dans certaines structures cellulaires, d'autre part de l'augmentation de l'activité totale.

La solubilisation se fait surtout à partir de la fraction chloroplastique. Elle est moins importante dans l'espèce résistante *G. anomalum*.

Le chloramphénicol inhibe en partie l'activité totale de la phosphatase acide et de la ribonucléase, résultante du traitement osmotique, mais n'a pas d'effet sur l'invertase qui est inhibée par la cycloheximide.

Cependant si une synthèse de protéine paraît être nécessaire à l'augmentation de l'activité totale de la phosphatase et ribonucléase, les essais de marquage et de purification par chromatographie sur colonne permettent de constater que ces deux enzymes ne sont pas néoformées mais résultent de la révélation de zymogènes.

SUMMARY

The effect of either osmotic or soil moisture stress on the activity of catalase and of some hydrolytic enzymes (acid phosphatase, ribonuclease, invertase and α - and β -amylases), was studied.

The increase in activity can be assigned to an increase in enzyme solubilization and to an increase in total activity.

Most of this solubilization affects the enzymes contained in the chloroplastic fraction. The drought resistant species *G. anomalum* presents a much smaller solubilization of acid phosphatase.

Chloramphenicol inhibits part of the total activity of acid phosphatase and ribonuclease, under osmotic stress conditions but has no effect on invertase activity which is inhibited by cycloheximide.

(1) Cet article constitue l'article principal d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sc. Nat.) enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.O. 4685 et soutenue le 8 juillet 1970 à la Faculté des Sciences d'Orsay.

(2) Adresse actuelle : Laboratoire d'Ecologie Végétale. Faculté des Sciences (91), Orsay, France.

Nevertheless even if it appears that protein synthesis is necessary to the rise of total activity of acid phosphatase and ribonuclease, labelling experiments and column chromatography of these enzymes show that they are not synthesized de novo but are rather the result of zymogene revelation.

INTRODUCTION

La résistance à la sécheresse des plantes supérieures peut être le résultat de deux types de caractéristiques. Le premier confère à ses plantes une « aptitude à éviter la déshydratation », certains aspects de ce type de résistance chez le Cotonnier ont été déjà publiés (VIEIRA-DA-SILVA, 1967). Le second correspond à l'« aptitude à résister à la déshydratation ».

Dans ce dernier cas, une des caractéristiques les plus importantes est celle de la stabilité de l'activité enzymatique. Ce sera l'objet du présent travail, se rapportant également aux espèces du genre *Gossypium*.

Il revient aux auteurs russes d'avoir les premiers observé les liaisons qui existaient entre l'état de dessèchement des tissus et l'activité des systèmes enzymatiques (OPARINE, 1953).

Déjà dès 1929, MAXIMOV suggérait que seule l'étude approfondie des particularités chimiques et physiques du protoplasma pourrait conduire à une compréhension plus complète de la nature de la résistance des plantes à la dessiccation, et ILJIN (1935, 1953) admettait que l'altération de la structure du protoplasma pendant le processus de déshydratation et de réhydratation était la cause des effets nuisibles du dessèchement qui conduit à la mort des tissus végétaux.

STOCKER (1961) dans sa revue des effets morphologiques et physiologiques du manque d'eau sur les plantes, souligne que la modification des processus enzymatiques est déterminée par une transformation de la structure du protoplasma. Il ajoute que dans le cadre d'une conception élargie de la physiologie, le déroulement de nombreux processus vitaux peut s'interpréter comme une alternance de périodes principalement réductrices-synthétisantes ou oxydantes-destructrices. A l'appui de son point de vue, il cite celui de MAXIMOV (1941) selon lequel l'action de la sécheresse (phase de réaction de STOCKER) aurait comme conséquence une période d'oxydation et d'hydrolyse catabolique, tandis que l'endurcissement (phase de restitution de Stocker) serait une période de réduction et de synthèse.

Encore d'après STOCKER (1961) ces tendances synthétisantes ou destructrices se rattacheraient aux différentes structures, lâches ou liées du protoplasma, telles qu'elles apparaissent dans les variations de la viscosité et de la perméabilité. L'élément de liaison entre les causes structurales et les conséquences fonctionnelles serait l'activité des enzymes en fonction de l'état du protoplasma.

Les travaux des chercheurs russes, OPARINE (1937), OPARINE et KADEN (1945), KURSANOV (1940, 1946) qui ont été passées en revue par MOTHES (1956) ont établi que les enzymes peuvent être libres ou liées au complexe lipoprotéique. Un relâchement de ces liaisons, soit réversible, soit irréversible, conséquence de plusieurs types de facteurs, dont la sénescence ou la déshydratation, provoque



une libération de ces enzymes et accroît leur activité hydrolytique (voir OPARIN, 1953).

Comme le souligne STOCKER (1961) l'action du déficit hydrique sur l'activité des enzymes, introduit des modifications d'une portée considérable dans l'ensemble du métabolisme.

Il a fallu attendre le développement d'instruments perfectionnés, comme le microscope électronique et l'ultracentrifugeuse, pour que les questions de l'ultrastructure cellulaire et de la localisation des activités enzymatiques puissent avancer.

C'est surtout l'école de DE DUVE (DE DUVE et WATTIAUX, 1966) qui a contribué à la découverte dans les tissus animaux d'organites spécialisés contenant de la phosphatase acide.

Ces particules nommées lysosomes contenaient de plus toute une série d'autres enzymes hydrolytiques : cathépsine, β -glucuronidase, ribonucléase acide, desoxyribonucléase acide; la lyse de ces organites était responsable de la libération de ces enzymes dans la cellule, libération suivie d'effets destructifs.

Un deuxième type de particules, els peroxysomes (voir DE DUVE et BAUDHUIN, 1966) séparés par BEAUFAY et *al.* (1964) contiennent les enzymes urate oxydase, catalase et D-amino acide oxydase.

L'existence de particules dans les cellules végétales, correspondant à celles trouvées chez les animaux, tout au moins en ce qui concerne leur fonction générale, a été confirmée par plusieurs auteurs.

Ces auteurs ont trouvé les équivalents des lysosomes soit dans les particules que DANGEARD (1919) a appelé sphérosomes (OLSZEWSKA et *al.*, 1965; WALEK-CZERNECKA, 1962, 1963, 1965; FREY WYSSLING et *al.*, 1963; FREY-WYSSLING, 1965; JACKS et *al.*, 1967; BALZ, 1966; SEMADENI, 1967; MATILE et *al.*, 1965; MATILE et SPICHIGER, 1968; SOROKIN, 1967; SOROKIN et SOROKIN, 1968), soit dans les vacuoles ou grains d'aleurone (POUX, 1963 *a, b*, 1965; MATILE et MOOR, 1968; MATILE, 1966, 1968 *a et b*, 1969; MATILE et WIEMKEN, 1967; JACKS et YATSU, 1967; YATSU et JACKS, 1968) soit dans l'appareil de Golgi (BRANDES et BERTINI, 1964) soit dans les lutoïdes du latex d'*Hevea* (PUJARNISCLE, 1965, 1966, 1968, 1969).

Cette localisation n'est pas exclusive et il ne paraît pas possible d'affirmer qu'un seul organite ou structure cellulaire correspond aux lysosomes, définis biochimiquement.

La découverte de phosphatase acide (RAGETLI et *al.*, 1966 et RAGETLI, 1967) et de ribonucléase (HADZIYEV et *al.*, 1969) liées aux chloroplastes montre que la situation est bien plus complexe que dans les cellules animales.

Il y a même des auteurs, comme CORBETT et PRICE (1967) qui nient l'existence de lysosomes chez les végétaux.

La notion de lysosome reste cependant valable comme définissant une structure contenant des hydrolases pouvant être libérées dans le contenu cellulaire par une action plus ou moins violente d'agents extérieurs.

Les travaux sur les peroxysomes dans les végétaux sont bien moins nombreux (KISAKI et TOLBERT, 1969; TOLBERT et *al.*, 1968, 1969; FREDERICK et NEWGOMB, 1969). Les peroxysomes des plantes isolées par l'école de Tolbert, ne contiennent pas le même bagage enzymatique que ceux des animaux. Tandis que

ceux-ci possèdent de l'uricase, D-amino acide oxidase et de la catalase, ceux des plantes contiennent (KISAKI et TOLBERT, 1969) de la glycolate oxidase, de la glutamate-glyoxylate aminotransférase, de la malate déshydrogénase et de la catalase.

L'importance de ce système particulière pour la photorespiration (Moss, 1968; NELSON et *al.*, 1969) est évidente, et on peut imaginer facilement que ce système puisse être responsable de l'augmentation de l'activité oxydasique indiquée par STOCKER (1961).

Outre les auteurs russes cités plus haut, d'autres chercheurs avaient déjà trouvé une augmentation de l'activité des enzymes hydrolytiques sous l'influence de la sécheresse : l'augmentation de l'activité de l'invertase a été observée par VASSILIEV et VASSILIEV (1936) celle de l'amylase par SPOEHR et MILNER (1939), celle de la ribonucléase par GATES et BONNER (1959), KESSLER (1959) et DOVE (1967) et celle de la phosphatase acide par NIR et POLJAKOFF-MAYBER (1966). La sécheresse provoquerait ainsi une accélération de la sénescence des feuilles.

Des études sur l'effet de la carence hydrique sur l'activité de la ribonucléase dans les tissus foliaires et racinaires de trois espèces de Cotonnier, sur l'activité soluble et totale de la phosphatase acide et sur l'effet des inhibiteurs ainsi que sur l'effet de la sécheresse sur les glucides solubles chez le Cotonnier, ont déjà été présentées (VIEIRA-DA-SILVA, 1968 *a, b, c*; 1969).

Les liaisons entre la solubilisation de la phosphatase et celle de l'invertase et de la β -amylase dans les descendants d'hybridation entre une espèce résistante, *G. anomalum*, et une espèce sensible à la sécheresse, *G. hirsutum*, ont également été étudiées (VIEIRA-DA-SILVA et POISSON, 1969).

L'augmentation de l'activité enzymatique sous l'effet de la sécheresse peut être considérée, soit comme le résultat d'une action lysosomale, c'est-à-dire de libération d'enzymes contenus dans des structures bien définies, soit comme le résultat d'activation de zymogènes, par disparition d'inhibiteurs de ces enzymes, soit encore comme le résultat d'une synthèse *de novo*.

Nos travaux ont eu pour but de déterminer si cette augmentation d'activité était due à une ou plusieurs de ces causes, de préciser la localisation cellulaire de ces enzymes et aussi d'observer la corrélation entre cette augmentation d'activité et la sensibilité à la sécheresse. La plupart des travaux a été faite sur les hydrolases et une seule expérience a été réalisée sur la catalase.

MÉTHODES ET TECHNIQUES GÉNÉRALES

Matériel végétal.

Plusieurs espèces du genre *Gossypium* L. (Fryxell, 1968) ont été utilisées pour ces études : les espèces cultivées *G. hirsutum* et *G. arboreum*, et les espèces sauvages *G. anomalum* et *G. thurberi*.

De la première espèce nous avons surtout utilisé la variété Allen, largement cultivée en Afrique de l'Ouest et les variétés BJA, HAR 444.2 et ATH 555.7. Les deux dernières sont respectivement originaires d'un croisement entre *G. hirsutum*, *G. arboreum* et *G. raimondii*, et entre *G. arboreum*, *G. thurberi* et *G. hirsutum*. Les hybrides obtenus ayant

été recroisés ensuite avec *G. hirsutum*. La race *punctatum* de cette espèce a aussi été utilisée.

L'espèce *G. arboreum* est originaire de l'Inde. *G. anomalum* est une espèce africaine qui se retrouve aussi bien dans l'hémisphère Nord que dans l'hémisphère Sud, à la lisière, du côté tropical, des deux grands déserts africains. Elle paraît être la seule espèce sauvage de Cotonnier qui ne constitue pas une relique, étant très bien adaptée à son habitat sec. *G. thurberi* est une espèce américaine originaire de l'Arizona, qui paraît être assez sensible à la sécheresse.

Techniques générales de culture en milieu liquide.

Nous avons voulu provoquer expérimentalement dans des conditions très contrôlées, le phénomène de sécheresse, selon une technique permettant de l'induire dans la plante à tout moment.

Dans ce but, nous avons effectué des cultures sur solution nutritive dont l'abaissement de potentiel osmotique nous permettait d'obtenir la contrainte hydrique souhaitée.

Cette technique ne cherche pas à imiter la sécheresse du sol, les conditions étant assez différentes (MACKLON et WEATHERLEY, 1965 *a, b*) mais à provoquer un déficit hydrique dans les plantes dans des conditions bien déterminées de potentiel hydrique du milieu racinaire.

Les cotonniers ont été cultivés sur une variante de la solution de HOAGLAND, ayant pour origine, pour les éléments majeurs, la solution utilisée par BRAUD (1967) pour la culture du cotonnier sur sable, mais modifiée légèrement, en vue de l'adapter à la culture en milieu liquide. La composition en oligo-éléments est celle proposée par HEWITT (1952).

L'eau utilisée provient d'un déminéraliseur Zerolit MB 6, à lits de résines mélangées. La culture est réalisée dans des pots en polyéthylène ayant une forme parallélépipédique de 13 cm de haut sur 10 cm de côté et contenant 800 ml de solution nutritive. Un système d'alimentation à niveau constant permet de remplacer la solution absorbée, par la même solution nutritive.

Utilisation des produits agissant sur le potentiel osmotique de la solution nutritive.

De nombreux produits ont été déjà utilisés pour provoquer un abaissement du potentiel hydrique des solutions de culture, notamment le NaCl, le mannitol, le saccharose et certains polymères organiques.

Les sels, comme le NaCl, ayant des effets secondaires très importants, nous avons cherché un produit qui, tout en étant inerte du point de vue métabolique, ne soit pas l'objet d'une consommation par des microorganismes, ce qui éliminait aussi bien le saccharose que le mannitol, voire même les dextrans.

L'absorption possible par la plante des produits agissant sur le potentiel osmotique est aussi un problème important. En effet les plantes peuvent absorber certaines petites molécules, ce qui abaisse le potentiel osmotique des tissus; elles s'adaptent ainsi à une diminution du potentiel de la solution nutritive.

Le polyéthylène glycol (PEG), qui présente des poids moléculaires pouvant varier de 200 à 20 000 et qui n'est pas fermentescible, paraît être une substance capable de remplir ce rôle de produit agissant sur la pression osmotique, dans nos expériences.

McCLENDEEN et BLINK (1952) sont les premiers auteurs à avoir utilisé le PEG comme produit modifiant la pression osmotique pour conserver l'activité et la structure des organites cellulaires.

Etudiant le PEG, COUPER et ELEY (1948), suggèrent la présence de groupements aldéhydes et par conséquent la possibilité d'une certaine toxicité. LARGERWERFF et *al.* (1961) qui proposèrent le PEG 20 000, purifié par dialyse, pour le contrôle du potentiel osmotique des solutions nutritives, pensent que les quantités excessives d'aluminium et de magnésium que le produit brut contenait seraient les responsables de la toxicité observée.

Les avis divergent également en ce qui concerne le choix du poids moléculaire du produit à utiliser. Ainsi JANES (1961, 1966) préfère utiliser des produits de poids moléculaires faibles et trouve même (JANES, 1966) que le PEG 400 est très peu absorbé par les plantes. LARGERWERFF et *al.* (1961) proposent le PEG 20 000, alors que JARVIS et JARVIS (1963) et MACKLON et WEATHERLEY (1965 *b*) utilisent le PEG 1540.

Le problème de l'absorption de ce produit est loin d'être résolu car LARGERWERFF et *al.*

(1961) ont trouvé un transport vers les feuilles, même avec le PEG 20 000; MACKLON et WEATHERLEY (1965 *b*) ont aussi observé un transport qu'ils interprètent comme la conséquence de son absorption par des racines traumatisées laissant le produit pénétrer directement dans le xylème. Cependant rien ne prouve qu'il soit passé dans la vacuole ni qu'il exerce un effet cellulaire de pression osmotique.

Le potentiel osmotique des solutions de PEG a été déterminé soit par cryoscopie (APPLEGATE, 1960) soit par des méthodes de tension de vapeur (LAGERWERFF et *al.*, 1961, MACKLON et WEATHERLEY, 1965 *a*).

Pour étudier l'influence du potentiel osmotique du milieu de culture sur le métabolisme de la plante, nous avons adopté le PEG 600 comme produit modifiant le potentiel osmotique.

Les solutions de PEG 600 ont été purifiées par passages successifs sur colonne de Dowex 1 et Dowex 50, ce qui enlève les ions contaminants et aussi certains produits toxiques non identifiés.

GREENWAY et HILLER (1967) et GREENWAY et *al.* (1968) adoptant le même protocole de purification constatent que le PEG ainsi traité n'est plus toxique pour *Chlorella*.

Le PEG 600 a l'avantage d'être liquide aux températures ambiantes et miscible à l'eau. Dans la gamme des concentrations utilisées les autres PEG essayés, polymères de poids moléculaire 1 000, 4 000, 6 000 et 20 000, donnent des solutions très visqueuses dont l'aération est difficile. En outre, pour obtenir un même potentiel osmotique, les quantités nécessaires doivent être supérieures à celles de PEG 600.

La détermination de ce potentiel pour le PEG 600 a été faite par la méthode cryoscopique (WALTER et THREN, 1934; CRAFTS et *al.*, 1949) et par la méthode de tension de vapeur utilisant un osmomètre Mechrolab 301 (WHATLEY, 1966). La méthode cryoscopique donne des potentiels osmotiques (en valeurs absolues) supérieurs à ceux obtenus par la méthode de tension de vapeur, ce qui confirme les observations de LAGERWERFF et *al.* (1961).

Ce phénomène trouve son explication dans la viscosité de la solution et dans la lenteur de la formation de glace dans les solutions concentrées donc très visqueuses (CRAFTS et *al.*, 1949).

Aussi, toutes nos déterminations ont-elles été faites par la méthode de tension de vapeur, fondée sur l'échauffement d'une goutte de solution, déposée sur une thermistance, dans une atmosphère saturée de solvant.

L'utilisation des tables d'abaissement molal relatif de tension de vapeur données par ROBINSON et STOCKES (1955) a permis d'étalonner l'osmomètre avec des solutions de NaCl.

Le potentiel hydrique de chaque solution de NaCl utilisée, peut être obtenu par la relation :

$$\psi = RT \ln \frac{p}{p_0}$$

qui donne la diminution d'énergie libre molaire pour chaque concentration, et que nous exprimons en joules mole⁻¹, ce qui peut être approximativement traduit en atmosphères, en l'affectant du facteur 0,56. Il est évident que les dimensions ne sont pas les mêmes dans les deux types d'expression et que thermodynamiquement seul le premier est correct (DAINTY, 1963; SLATYER et TAYLOR, 1960).

Afin de confirmer l'innocuité du PEG 600 purifié, comme agent osmotique nous avons mesuré la variation de l'intensité de transpiration de plantes âgées de deux mois de la variété Allen de *G. hirsutum*, soumises à un traitement osmotique.

Trois groupes ont été constitués, comprenant chacun 10 plantes, un groupe témoin recevant la solution nutritive normale et les deux autres, une solution où le potentiel osmotique était abaissé à — 9 j. mole⁻¹ soit par du mannitol soit par du PEG 600.

Le traitement osmotique a été appliqué trois fois. Les deux premières fois il a duré trois jours, la troisième fois deux jours. Entre les traitements toutes les plantes recevaient la solution normale.

La figure 1 rend compte des résultats obtenus. Ils indiquent une diminution de la transpiration, due au traitement osmotique, par rapport au témoin. Le retour à une transpiration normale est cependant beaucoup plus facile pour les plantes traitées au PEG que pour celles traitées au mannitol, qui pourtant n'est pas considéré comme un produit toxique.

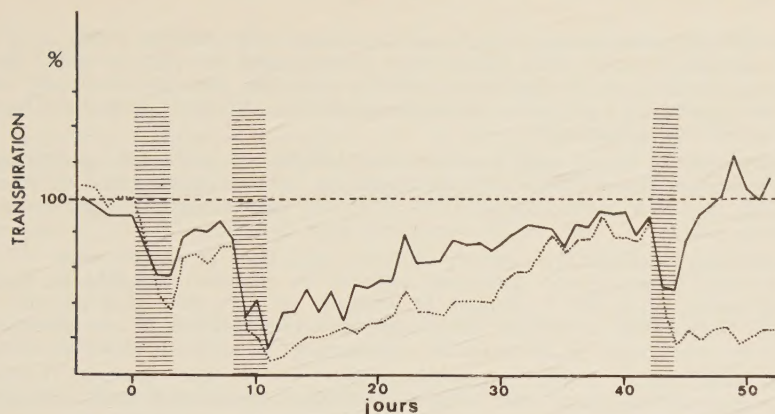


FIG. 1. — Transpiration relative par rapport au témoin. En hachures, les périodes d'application du traitement osmotique.

— PEG 600.
 Mannitol.
 - - - - - Témoin.

TABLEAU I

Comparaison entre PEG 600 et Mannitol comme produits modifiant la pression osmotique.

	Matière sèche, grammes par plante			
	Coton-graine	Feuilles	Tiges	Racines
Témoin	17,4	4,4	21,3	6,3
PEG 600 — 9 j mole ⁻¹	11,5	7,6	21,0	6,9
Mannitol — 9 j mole ⁻¹	5,3	4,9	12,5	5,0

A la fin de l'expérience, la quantité de feuilles dans les plantes traitées au PEG, appréciée par la quantité de matière sèche, est supérieure à celle des plantes témoins (Tableau I). Ces dernières sont en fin de cycle végétatif, alors que les premières ont encore des feuilles jeunes, apparues après les traitements osmotiques.

Les résultats présentés nous ont confirmé le choix du PEG 600 comme produit osmotique pour l'induction de déficit hydrique dans les plantes cultivées en solution nutritive.

Préparation des échantillons et expression des résultats.

Les analyses enzymatiques étaient généralement, faites sur la quatrième feuille de l'axe principal de la plante, comptée à partir de l'apex, considérée physiologiquement mure, non seulement par des critères phénologiques, mais aussi parce qu'elle présente l'activité spécifique la plus élevée de la phosphatase acide.

L'induction de conditions de sécheresse était réalisée soit par l'addition de PEG 600 au milieu liquide de culture, soit par des cycles successifs de dessèchement des plantes cultivées dans des récipients contenant de la terre, soit par flottaison de disques découpés dans la quatrième feuille sur des solutions de PEG 600, pendant un temps variant de 12 à 24 heures.

Toutes les opérations d'extraction se passaient dans une chambre froide à 5 °C. Les tissus foliaires étaient broyés dans un mortier refroidi, avec un peu de sable dans une solution isotonique de mannitol (0,3 M) de façon à préserver, dans la mesure du possible, l'intégrité des organites. La proportion généralement utilisée était de 1 g de tissu frais pour 50 ml de volume final d'homogénat.

Après filtration de l'homogénat à travers deux couches de gaze, deux parties aliquotes étaient prélevées, une étant diluée avec 40 % de son volume de mannitol 0,3 M, l'autre avec 40 % de son volume de Triton x-100 à 0,5 % (dans certaines expériences on a utilisé le Triton x-114).

Des expériences préliminaires avaient démontré que, dans le cas de tissus de plantes normales broyées soigneusement dans une solution de mannitol 0,3 M, le surnageant après centrifugation à 36 000 g pendant 15 minutes, ne présentait généralement aucune activité de la phosphatase acide. Les deux aliquotes citées ci-dessus étaient donc toujours centrifugées de cette façon et les activités enzymatiques déterminées dans le surnageant.

Ce protocole conduit à deux types de données. Le premier concerne l'activité des enzymes normalement présentes dans la phase soluble, auxquelles il peut s'ajouter celles qui ont été solubilisées par un broyage un peu trop brutal. Le deuxième concerne l'activité des enzymes qui peuvent être solubilisées par destruction des membranes lipoprotéiques sous l'action du détergent.

On a pu faire ainsi une distinction entre activité libre et activité latente. Il faut cependant préciser que l'activité soluble mesurée par la méthode adoptée ne représente pas toute l'activité libre, car des enzymes peuvent rester adsorbées dans le culot.

Toutefois, pour mesurer l'activité libre en présence des organites contenant des enzymes il faudrait utiliser des temps d'incubation très courts et des milieux à pH proche de la neutralité de façon à éviter que ces organites ne se détruisent pendant les opérations. Cela est irréalisable dans le cas des dosages des hydrolases sur des tissus de Cotonnier. D'après GAHAN (1965), l'incubation de coupes du méristème terminal de racines de *Vicia faba* pendant 5 minutes à pH 5 était suffisante pour révéler l'activité latente de la phosphatase acide.

En outre, nous avons observé, dans des conditions de sécheresse, des activités solubles de la phosphatase acide et de la ribonucléase acide, pouvant atteindre 100 % de l'activité en présence de Triton X-100 (l'activité latente étant alors nulle), ce qui indique que l'adsorption de ces enzymes sur les membranes doit être négligeable.

Nous admettons donc que l'activité dite soluble représente l'activité libre, et que l'activité solubilisée après traitement au Triton X-100, correspond à l'activité totale.

Cela nous conduit à la notion de *pourcentage de solubilisation*, qui mesure la destruction des structures responsables de la latence de ces enzymes.

L'augmentation d'activité spécifique totale pouvait être la conséquence soit d'activation ou de lever d'inhibition des enzymes, soit d'une synthèse *de novo* par dépression des gènes concernés.

Analyse enzymatique.

— La *phosphatase acide* (EC 3.1.3.2.) a été dosée selon le procédé proposé par LINHART et WALTER (1963). Le volume total d'incubation est de 2 ml contenant 20 μ moles de p-nitrophenyl phosphate (pNP) et du tampon acétate 0,1 M à pH 5,6.

— La *ribonucléase* (EC 2.7.7.17) a été dosée selon la méthode de SCHUCHER et HOKIN (1954). Le volume total d'incubation est de 1 ml, contenant 3 mg d'acide ribonucléique (ARN), du tampon acétate 0,1 M à pH 5,0 et une aliquote convenable d'homogénat.

L'activité de l'enzyme était exprimée directement en valeurs de densité optique (DO) déterminée à 260 nm par mg de protéine et par heure.

— Les *amylases*, α (EC 3.2.1.1.) et β (EC 3.2.1.2.) ont été dosées respectivement à pH 7,0 et à pH 4,5 suivant la technique de BERNFELD (1955), utilisant l'amylopectine comme substrat. A l'issue de ces déterminations les sucres réducteurs ont été dosés soit par la méthode de NELSON (ASHWELL, 1957) soit par l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Les incubations ont été faites à 30 °C.

La β -*fructofuranosidase* (invertase) (EC 3.2.1.26) a été dosée dans un volume total de 2 ml, contenant du tampon acétate 0,01 M à pH 5,0 et utilisant comme substrat le saccharose à une concentration finale de 1 %. Les sucres réducteurs ont été dosés comme dans le cas de la α et β amylases. Les incubations étaient faites à 30 °C.

La *catalase* (EC 1.11.1.6.) a été dosée par la méthode manométrique de BUNZEL (1914) après avoir broyé 0,5 g de tissu foliaire avec 0,5 g de CaCO_3 précipité, et en amenant le volume à 25 ml avec de l'eau. Le substrat a été l'eau oxygénée à la concentration de 4 %. Les incubations ont été faites dans un bain contenant de la glace fondante.

La *O-diphénol oxydase* (phénolase) (EC 1.10.3.1.) a été dosée en utilisant la DL- β -3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) comme substrat à 0,2 % de concentration finale. Le milieu réactionnel contenait du tampon phosphate 0,1 M à pH 6,5 et une aliquote d'homogénat. Les incubations ont été faites à 30 °C. L'oxydation de la DOPA était appréciée par lecture au colorimètre Klett Summerson (filtre 42).

Protéine et chlorophylle.

La protéine a été dosée par la méthode de LOWRY et *al.* (1951) et la chlorophylle par celle d'ARNON (1949).

Centrifugation différentielle et en gradient de densité.

Toutes les opérations d'homogénéisation ont été réalisées dans une chambre froide à 5 °C, 60 g de limbe de la 4^e feuille ont été broyées avec un peu de sable dans un mortier refroidi, dans 500 ml d'un milieu constitué par du mannitol 0,3 M, tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5, EDTA 1mM, polyvinylpyrrolidone 0,2 % et 2-mercaptoethanol 1 mM.

a) Centrifugation différentielle.

Après filtration par 2 couches de gaze, et centrifugation à 100 g pendant 15 minutes pour enlever les débris de tissu foliaire et le sable, des aliquotes étaient centrifugées, dans une centrifugeuse réfrigérée à 5 °C. Trois fractions sont recueillies : une sédimentable par 1 heure de centrifugation à 3 000 g, une deuxième sédimentable par 1 heure de centrifugation à 40 000 g et une troisième constituée par le surnageant de cette dernière centrifugation.

Pour les analyses enzymatiques, les culots et les surnageants étaient repris dans un même volume de tampon contenant du Triton X-100 à une concentration finale de 0,1 %. Les valeurs de chaque fraction sont exprimées en pourcentage du total.

Cette méthode réduisant les manipulations au minimum a été adoptée après de nombreux essais de façon à endommager le moins possible les organites de chaque fraction.

b) Centrifugation en gradient de densité.

La technique généralement adoptée pour centrifugation en gradient de densité, utilise des solutions concentrées de saccharose (DE DUVE et *al.*, 1959) dont l'effet osmotique sur les organites cellulaires n'est pas négligeable.

Pour obvier à cet inconvénient, d'autres produits ont été proposés, comme le polyvinylpyrrolidone (THOMSON et KLIPFEL, 1958), le glycogène (BEAUFAY et *al.*, 1964), le Ficoll (KAMAT et WALLACH, 1965) et le Dextran (MACH et LACKO, 1968).

Ces produits, convenablement mélangés avec du saccharose, permettent l'obtention de gradients approximativement isoosmotiques.

Nous avons, dans nos expériences, adopté le Dextran, de poids moléculaire moyen de 15 000 pour la production des gradients de densité d'après la méthode d'AYAD et *al.* (1968). Ces gradients, dans des tubes de rotor Spinco SW.25.1, vont d'une concentration de 40 % de Dextran + 10 % de saccharose dans le fond du tube (densité 1,167 à 25 °C), jusqu'à 10 % de saccharose en haut du gradient (densité 1,038 à 25 °C). Chaque tube contient 25 ml de gradient plus 7 ml d'homogénat (0,3 M en mannitol).

Après centrifugation pendant 2 heures à 25 000 t/min des fractions de 1 ml sont récoltées par aspiration par une pompe proportionnante Technicon, après avoir percé le tube par le fond.

Chromatographie sur colonne.

De façon à éliminer, dans la mesure du possible, l'action des composés phénoliques sur l'activité des enzymes, nous broyons les échantillons de la troisième et quatrième feuilles à compter de l'apex avec un poids égal du polyvinylpyrrolidone (Polyclar AT) insoluble (LOOMIS et BATAILLE, 1968) dans du tampon Hepes (GOOD et *al.*, 1966) 0,1 M pH 7,0 contenant de l'EDTA 0,1 mM et du dithiothreitol 0,1 mM (CLELAND, 1964).

L'homogénat est traité avec du Triton X-100 à une concentration finale de 0,2 %, centrifugé, dialysé contre du tampon Tris 0,01 M à pH 7,5 contenant 5 mM de 2-mercaptoéthanol et concentré 5 fois contre du PEG 20 000.

Les extraits préparés de la façon indiquée sont appliqués sur une colonne de DEAE-cellulose de 1,6 cm de diamètre par 35 cm de long équilibrée avec du tampon Tris 0,01 M pH 7,5.

L'élution était faite par 100 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,5 contenant du 2-mercaptoéthanol 5 mM, suivis par un gradient exponentiel de NaCl (dans le même tampon Tris). Les concentrations de départ et finales étant connues, le gradient obtenu est confirmé à l'aide d'un réfractomètre. Des fractions de 5 ml sont récoltées à un débit de 0,8 ml par minute.

Marquage des protéines.

Une languette, découpée en trois de ses côtés dans la troisième et quatrième feuilles à compter de l'apex, à l'extrémité libre introduite dans une capsule en gélatine contenant 0,2 ml de solution de L-leucine (U) ^{14}C (5 $\mu\text{Ci/ml}$), avec une activité spécifique de 95 mCi/mM.

Après 24 heures la troisième et quatrième feuilles étaient récoltées, broyées ensemble et traitées, comme il est indiqué ci-dessus, l'extrait obtenu étant chromatographié sur colonne de DEAE-cellulose.

La radioactivité de chaque fraction de 5 ml récoltée est mesurée avec un compteur à scintillation : une aliquote de 0,25 ml de chaque est additionnée de 10 ml de mélange scintillateur.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

AUGMENTATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.

a) Catalase.

Une seule expérience a été réalisée sur l'effet du potentiel osmotique sur l'activité de la catalase. Six lots de trente disques de 0,8 cm de diamètre provenant de la quatrième feuille de la variété Allen de *G. hirsutum* ont été mis en équilibre avec des solutions de saccharose de molarités différentes, en les faisant flotter sur ces solutions pendant 20 heures, la surface abaxiale vers le haut. La figure 2 rend compte de la variation de l'activité de la catalase dans ces tissus en fonction de la molarité du saccharose.

Ces données confirment celles déjà obtenues chez la Tomate par FARKAS et RAJHATY (1955), et par VIEIRA-DA-SILVA (1965) chez plusieurs espèces de *Gossypium*. Ces derniers résultats ont montré qu'il y avait de très grandes différences entre les espèces quant à la révélation de la catalase par l'effet du traitement osmotique et paraissaient indiquer qu'un indice simple, d'altération métabolique pouvait être donc établi comme critère pour distinguer entre les plantes résistantes et les plantes sensibles à la sécheresse.

Ce phénomène de révélation de la catalase par l'effet de la carence hydrique gagne un intérêt tout spécial à la lumière de la localisation de cette enzyme dans les peroxysomes végétaux, et de l'importance qu'elle peut avoir dans l'oxydation de l'acide glycolique et donc dans la photorespiration.

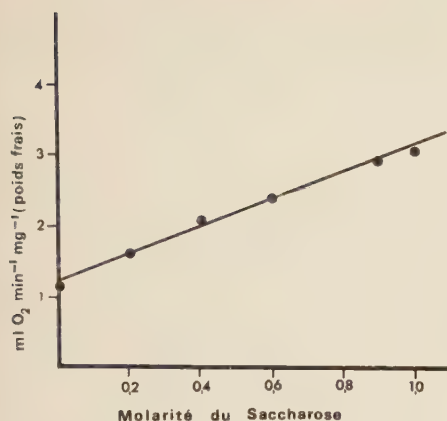


FIG. 2.

FIG. 2. — Influence de la molarité du saccharose sur l'activité de la catalase de disques de feuilles de *G. hirsutum* variété Allen.

FIG. 3. — Liaison entre la solubilisation de la phosphatase acide et celle de la ribonucléase chez *G. thurberi*.

● Témoins.

○ Traitement osmotique de - 10 j mole⁻¹ pendant 48 h.

$Y = 24,43 + 0,568 X$.

$r = 0,84$ $P < 0,01$.

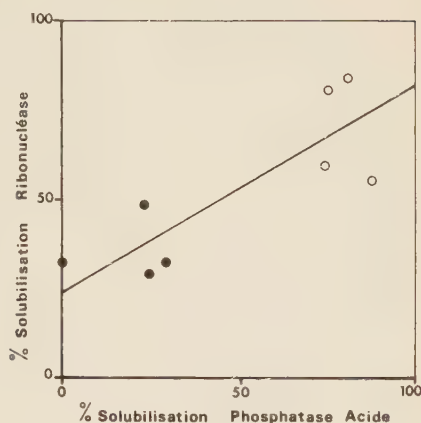


FIG. 3.

Cependant l'effet de la sécheresse sur les tissus foliaires du cotonnier ayant des aspects typiques d'une sénescence accélérée, nous avons étudié plus en détail les variations d'activité des enzymes hydrolytiques, dont l'action pourrait conduire à cette sénescence.

b) Les hydrolases.

Dans des travaux antérieurs (VIEIRA-DA-SILVA, 1968 *a, b*, 1969) l'effet de la sécheresse sur l'augmentation de l'activité de la ribonucléase et de la phosphatase acide avait déjà été démontré.

Cet effet se traduit pour cette dernière enzyme, non seulement par sa solubilisation plus importante mais aussi par une augmentation de l'activité totale (VIEIRA-DA-SILVA, 1968 *b*). Les espèces plus résistantes à la sécheresse se caractérisent, cependant, par une solubilisation réduite de la phosphatase et par une faible augmentation d'activité totale, dans les conditions de carence hydrique.

Afin d'étudier la liaison entre la phosphatase acide d'un côté et la ribonucléase de l'autre, une expérience a été réalisée en culture liquide en utilisant des plantes de *G. thurberi* âgées de deux mois. Quatre plantes ont été soumises à un traitement osmotique de - 10 j. mole⁻¹ pendant 48 heures et quatre autres plantes ont été utilisées comme témoins (fig. 3 et 4).

On a constaté qu'il existe non seulement une liaison entre la solubilisation de la phosphatase acide et celle de la ribonucléase, mais également une corrélation très étroite entre les augmentations de l'activité totale de ces deux enzymes.

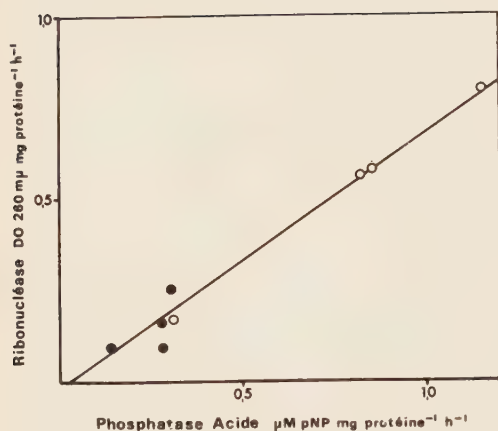


FIG. 4.

FIG. 4. — Liaison entre l'activité totale de la phosphatase acide et celle de la ribonucléase chez *G. thurberi*. Mêmes traitements que dans la figure 7.

$$Y = 0,038 + 0,727 X.$$

$$r = 0,99 \text{ } P < 0,01.$$

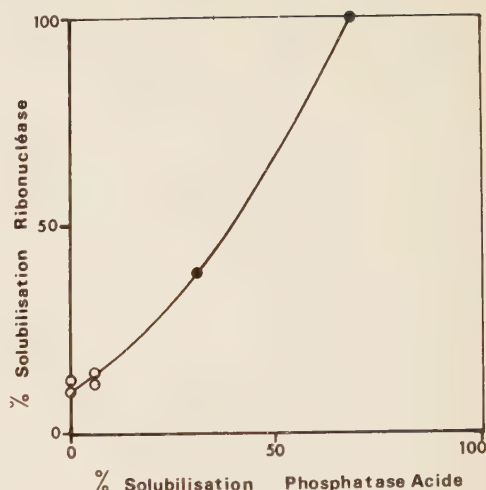


FIG. 5.

FIG. 5. — Liaison entre la solubilisation de la phosphatase acide et celle de la ribonucléase chez *G. hirsutum* variété HAR 444.2.

○ Témoins.

● Sécheresse du sol.

Chez *G. hirsutum*, soumis à la sécheresse naturelle par dessèchement du sol, la solubilisation concomitante de la phosphatase acide et de la ribonucléase a aussi pu être vérifiée (fig. 5).

D'autres études ont été réalisées en culture en terre, pour comparer l'espèce *G. anomalum*, à la race *punctatum* et aux variétés Allen, HAR 444. 2, ATH 555. 7 et BJA de l'espèce *G. hirsutum*, en ce qui concerne leur comportement vis-à-vis de la sécheresse.

Les plantes ont été cultivées dans des pots en plastique contenant 700 g de terre sèche, arrosés journellement jusqu'au poids correspondant à la capacité au champ.

Un mois après les semis, les plantes de chaque variété ont été divisées en deux groupes : un groupe témoin continuant à être arrosé régulièrement, l'autre étant soumis à 5 cycles successifs de dessèchement. Chaque traitement a été répété 4 fois.

Le dessèchement a été conduit jusqu'au flétrissement permanent et les plantes n'étaient arrosées de nouveau qu'après deux jours de flétrissement.

Après le cinquième cycle, la quatrième feuille de chaque plante a été récoltée et la phosphatase acide et la β -fructofuranosidase dosées.

Les résultats de cette expérimentation sont donnés par le tableau II et la figure 6.

TABLEAU II

Pourcentage de solubilisation de la phosphatase acide et de la β -fructofuranosidase.

	Phosphatase acide		β -fructofuranosidase	
	Témoin	Sécheresse	Témoin	Sécheresse
<i>G. anomalum</i>	12,3	7,1	0	14,5
<i>G. punctatum</i>	4,9	25,0	66,8	41,3
Allen	27,3	62,6	29,4	61,3
HAR 444.2	24,4	94,8	36,0	81,9
ATH 555.7	15,4	40,2	32,4	48,9
BJA	18,5	66,0	31,3	66,3
	$p = 0,05 \pm 31,2$		$p = 0,05 \pm 22,6$	
	0,01 $\pm 42,1$		0,01 $\pm 30,7$	
	0,001 $\pm 55,8$		0,001 $\pm 41,3$	

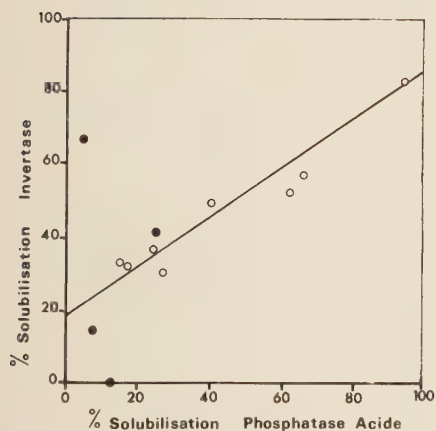


FIG. 6.

FIG. 6. — Liaison entre la solubilisation de la phosphatase acide et celle de l'invertase. Sécheresse du sol.

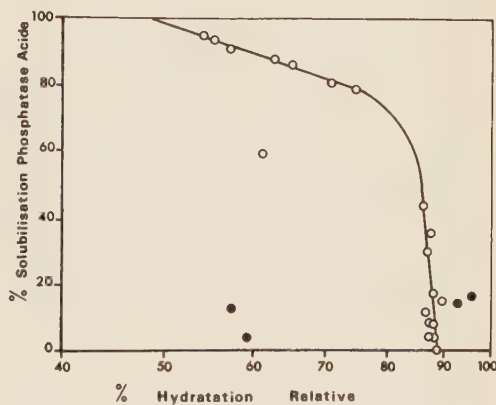
○ *G. hirsutum latifolium*.● *G. hirsutum punctatum* et *G. anomalum*.Pour *G. hirsutum latifolium* : $Y = 18,68 + 0,68 X$. $r = 0,98$ $P < 0,01$.

FIG. 7.

FIG. 7. — Solubilisation de la phosphatase acide en fonction de l'hydratation relative des feuilles.

○ *G. hirsutum*.● *G. anomalum*.

Il est évident qu'il existe une relation entre la libération de la phosphatase acide et celle de la β -fructofuranosidase, dans le cas des variétés sensibles à la sécheresse : Allen, HAR 444.2, ATH 555.7 et BJA. Cependant, pour *G. anomalum* et *G. hirsutum* race *punctatum* cette liaison n'existe pas, la solubilisation

de la phosphatase acide étant toujours réduite, tandis que celle de la β -fructofuranosidase peut même atteindre des valeurs élevées, comme pour la race *punctatum*.

Parmi les enzymes hydrolytiques certains, comme la phosphatase acide et la ribonucléase, ont une action destructive qui peut être extrêmement nuisible au métabolisme cellulaire. D'autres, par contre, comme l'amylase et l'invertase, peuvent avoir des effets bénéfiques, en diminuant le potentiel osmotique des tissus ce qui peut faciliter le maintien de la turgescence. En effet, nous avons montré (VIEIRA-DA-SILVA, 1968 c) que le potentiel osmotique de la sève extraite par pression dépendait de la quantité de sucres solubles dans les tissus foliaires. Ces résultats, qui contredisent cependant ceux de BIELORAI (1968) sur des agrumes, montrent que, tout au moins pour le Cotonnier, l'action des amylases et des invertases, ayant pour effet d'augmenter la force de succion des feuilles, pourrait ne pas être désavantageuse.

Il avait déjà été démontré dans un travail antérieur (VIEIRA-DA-SILVA et POISSON, 1969) que, dans les espèces résistantes, l'amylase et l'invertase peuvent être solubilisées sans que le soit la phosphatase acide, et que cette caractéristique est transmissible.

Dans deux répétitions de l'essai sur l'action des cycles répétés de dessèchement du sol, l'activité de la phosphatase acide dans la quatrième feuille, et l'hydratation relative (HEWLETT et KRAMER, 1963) de la troisième feuille ont été déterminées sur chaque plante.

La figure 7 rend compte de la liaison entre la solubilisation de la phosphatase acide dans la quatrième feuille et l'hydratation relative de la troisième feuille.

Cette figure semble démontrer l'existence de deux compartiments, l'un se solubilisant plus facilement que l'autre. Il est aussi intéressant de noter que la solubilisation est totale pour des valeurs de l'hydratation relative considérées habituellement comme léthales. On peut aussi voir que l'espèce résistante, *G. anomalum*, ne manifeste pas de solubilisation appréciable de la phosphatase acide à mesure du dessèchement de la feuille. Il s'agit en effet d'une espèce extrêmement bien adaptée à son habitat aride (CHEVALIER, 1933; SAUNDERS, 1961).

LOCALISATION DES ENZYMES DANS LA CELLULE ET LEUR SOLUBILISATION.

a) Etudes par centrifugation différentielle.

Pour vérifier la répartition de l'activité enzymatique dans les différentes fractions cellulaires sous l'effet de la sécheresse, trois groupes de plantes de *G. thurberi* ont été utilisés.

Le premier, groupe A, constitué par des plantes cultivées en serre pendant 3 mois, en solution nutritive normale, en conditions d'humidité de l'air entre 80 % et 95 % d'humidité relative et transpiration faible.

Le second, groupe B, était formé de plantes cultivées dans les mêmes conditions que celles du groupe A, mais après un séjour d'une semaine dans une chambre conditionnée à 25 °C et 50 % d'humidité relative, où elles étaient

éclairées par des lampes à vapeur d'iode, dont l'infra-rouge était absorbé par une couche de 5 cm d'eau courante, produisant 20 000 lux au niveau des feuilles supérieures, dans un cycle de 12 heures de jour, 12 heures de nuit.

Le troisième, groupe C, était soumis au même traitement que le groupe B, et recevait, en plus, un traitement osmotique de -15 j. mole^{-1} pendant les dernières 48 heures.

Ces 3 groupes correspondant ainsi à des conditions croissantes de sécheresse : le premier formé par des plantes qui ne souffrent pas de sécheresse, le deuxième par des plantes qui transpirent abondamment dans des conditions de sécheresse atmosphérique, et le troisième par des plantes dont les feuilles se trouvent flétries en permanence pendant les dernières 24 heures.

Les tissus foliaires ont été broyés et fractionnés par centrifugation comme il est indiqué plus haut.

Trois fractions ont été séparées : une fraction lourde riche en chloroplastes, une fraction moyenne et le surnageant.

Sur chacune de ces fractions il a été dosé : les quantités de chlorophylle et des protéines; ainsi que les activités : phosphatase acide, ribonucléase acide, β -fructofuranosidase, α et β amylase et O-diphenol oxydase.

Sur la figure 8, la surface de chaque rectangle représente le pourcentage de l'activité totale de l'enzyme contenu dans cette fraction. En abscisse on a porté la quantité de protéine dans la fraction exprimée en pourcentage du total, et en ordonnées l'*activité relative* obtenue en divisant le pourcentage d'activité de chaque fraction par le pourcentage de protéines. Dans le cas de la chlorophylle, il s'agit de quantités et non d'activités.

La distribution des protéines par fraction varie en fonction du traitement. Dans le traitement A la fraction chloroplastique contient 67,9 % de la protéine, la fraction moyenne 11,6 % et e surnageant 20,5 %. Dans le traitement B les pourcentages sont respectivement 35,0 %; 11,9 % et 53,1 %. Dans le traitement C ils sont de 21,5 %, 3,5 % et 75,0 %.

On peut dire que les fractions chloroplastiques et moyennes se « vident » d'une partie de leurs protéines qui passe dans la phase soluble. La première conserve cependant toute sa chlorophylle (fig. 8 a).

Toutes les enzymes essayées se solubilisent sous l'effet de l'augmentation de l'intensité de la sécheresse : la β -fructofuranosidase et les α et β amylases le font de façon assez semblable, tandis que la phosphatase acide, la ribonucléase et l'O-diphenol oxydase se comportent de façon différente les unes des autres.

Il paraît toutefois évident que la partie la plus importante de l'activité solubilisée sous l'effet de la sécheresse, provient de la fraction chloroplastique.

b) Etudes par centrifugation en gradient de densité.

Un pourcentage élevé de l'activité totale de la phosphatase acide, ainsi que celle des autres enzymes étudiées, se trouve concentré dans la fraction riche en chloroplastes.

Cette fraction libère, dans des conditions de sécheresse, l'activité enzymatique dans la phase soluble. Nous avons voulu vérifier si la diminution du potentiel osmotique de l'homogénat *in vitro* pouvait conduire à une telle libération.

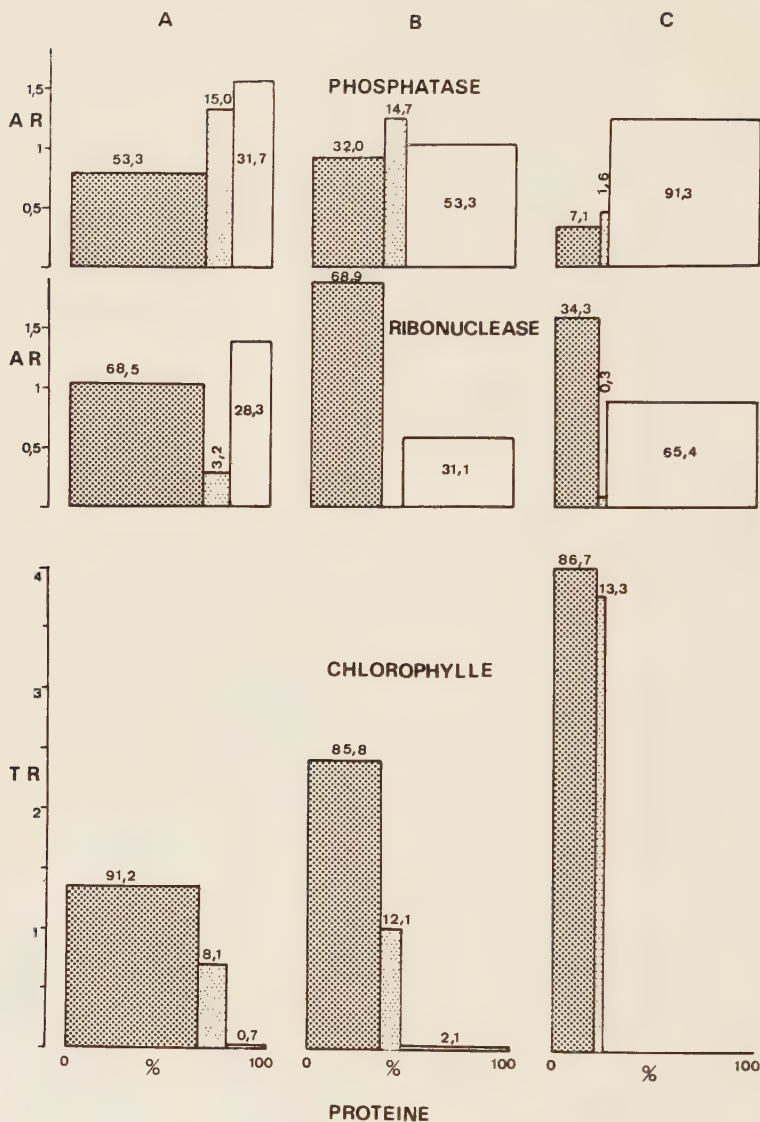


FIG. 8a. — Distribution de l'activité des enzymes et de la quantité de chlorophylle dans trois fractions cellulaires. En gros pointillé la fraction chloroplastique, en pointillé fin léger la fraction moyenne, en blanc le surnageant. Il est indiqué sur chaque rectangle le pourcentage de l'activité, ou de la teneur, qui correspond à la fraction. En abscisses la largeur du rectangle correspond au pourcentage de protéine dans la fraction. En ordonnées l'activité relative (AR), ou teneur relative (TR), est le rapport entre le pourcentage d'activité ou de teneur et le pourcentage de protéine, qui correspondent à chaque rectangle.

A - sans sécheresse; B - sécheresse atmosphérique; C - sécheresse atmosphérique et choc osmotique.

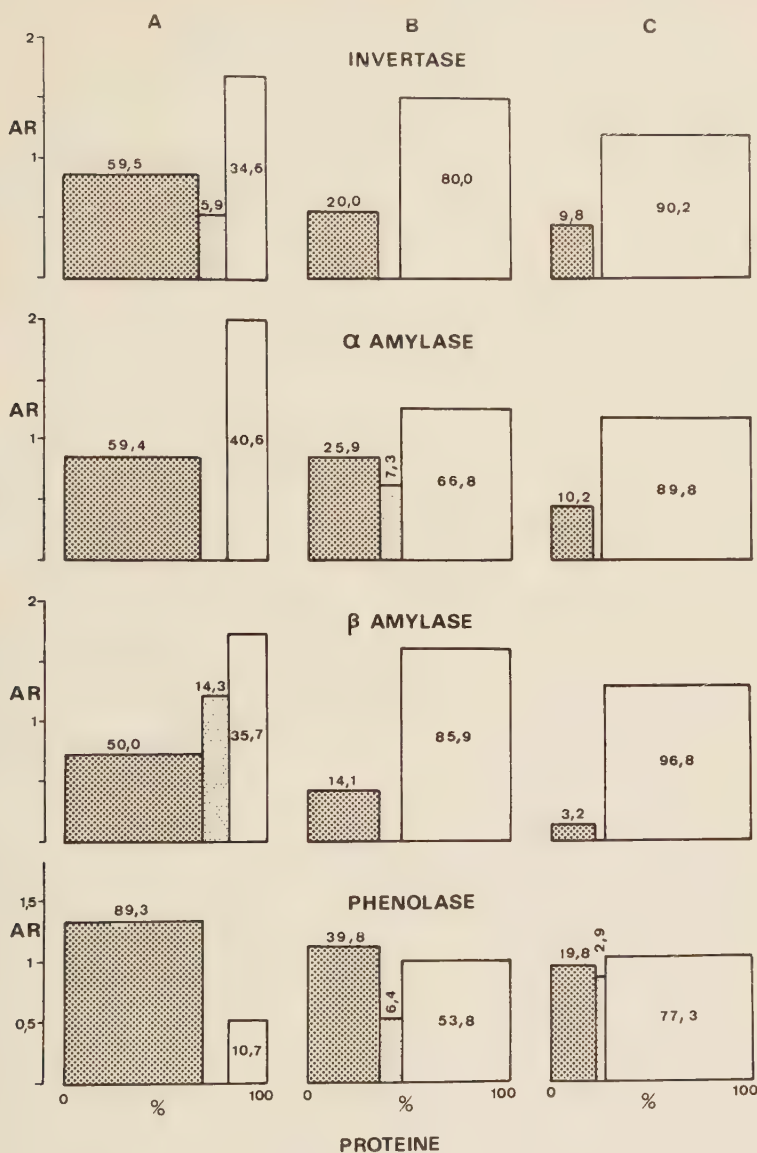


FIG. 8b. — Même légende que pour la figure 8a.

Un homogénat préparé d'après les procédés déjà indiqués a été divisé en 11 parties aliquotes et centrifugé à 40 000 g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée. Dix de ces culots ont été remis en suspension dans des solutions de saccharose de molarités croissante. Un culot a été remis en suspension dans une solution de Triton X-100 à 0,25 % pour solubiliser l'activité totale.

Après incubation pendant deux heures à 5 °C les aliquotes ont été centrifugées et la phosphatase acide dosée dans le surnageant.

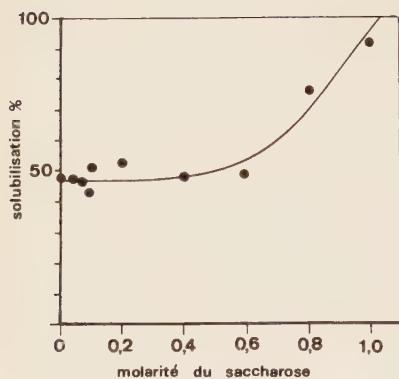


FIG. 9. — Solubilisation de la phosphatase acide sous l'influence de la molarité du saccharose chez les chloroplastes de *G. thurberi*.

On peut voir d'après la figure 9 que 50 % de l'activité se libère déjà par les manipulations imposées au culot. Néanmoins la suspension du culot soit dans l'eau, soit dans une concentration hypotonique de saccharose, ne conduit pas à une plus grande libération que celle déjà observée avec la solution isotonique (0,3 M) de saccharose. Par contre la suspension dans des concentrations plus grandes que 0,6 M de saccharose conduit à la libération de la phosphatase acide, libération qui est totale à 1 M de concentration. Ce comportement est en opposition avec celui des lysosomes qui libèrent leurs enzymes par suspension dans une solution hypotonique. Ces résultats nous permettent de comprendre l'action de la sécheresse sur la fraction chloroplastique qui paraît être sensible à une diminution du potentiel osmotique. Les surnageants des traitements 0,8 M et 1 M de saccharose étaient opalescents, ce qui ne se vérifiait pas dans les autres traitements.

Nous avons ainsi écarté la technique courante de centrifugation en gradient de saccharose (DE DUVE et *al.*, 1959), car le potentiel osmotique des solutions concentrées peut influencer la distribution particulière des enzymes.

Des homogénats ont été réalisés de la quatrième feuille de plantes de *G. thurberi* cultivées, soit en solution nutritive normale (groupe témoin), soit dans la même solution mais recevant un traitement osmotique de -15 j. mole^{-1} pendant 48 heures avant la récolte. Le milieu de broyage utilisé était celui déjà indiqué.

Sept ml de l'homogénat ont été déposés sur un gradient linéaire, réalisé comme il a été indiqué dans la méthodologie, et centrifugés à 25 000 t/min pendant 2 heures et demi dans un rotor SW.25.1. Des fractions de 1 ml ont été récoltées. Sur le culot ainsi que sur chaque fraction les dosages suivants ont été faits : protéine, chlorophylle, phosphatase acide, ribonucléase acide et O-diphénol oxydase, comme précédemment décrit. Les résultats des dosages par fraction sont exprimés en pourcentage soit de l'activité totale, soit de la teneur totale dans le gradient.

Les figures 10, 11, 12 et 13 rendent compte des résultats obtenus :

a) Protéines et chlorophylle (fig. 10). Nous pouvons ainsi confirmer que la fraction chloroplastique perd des protéines au profit du surnageant sous l'effet du traitement osmotique. Deux types de chloroplastes peuvent être identifiés, un plus lourd, encore riche en protéine, et l'autre plus léger, bien moins riche en

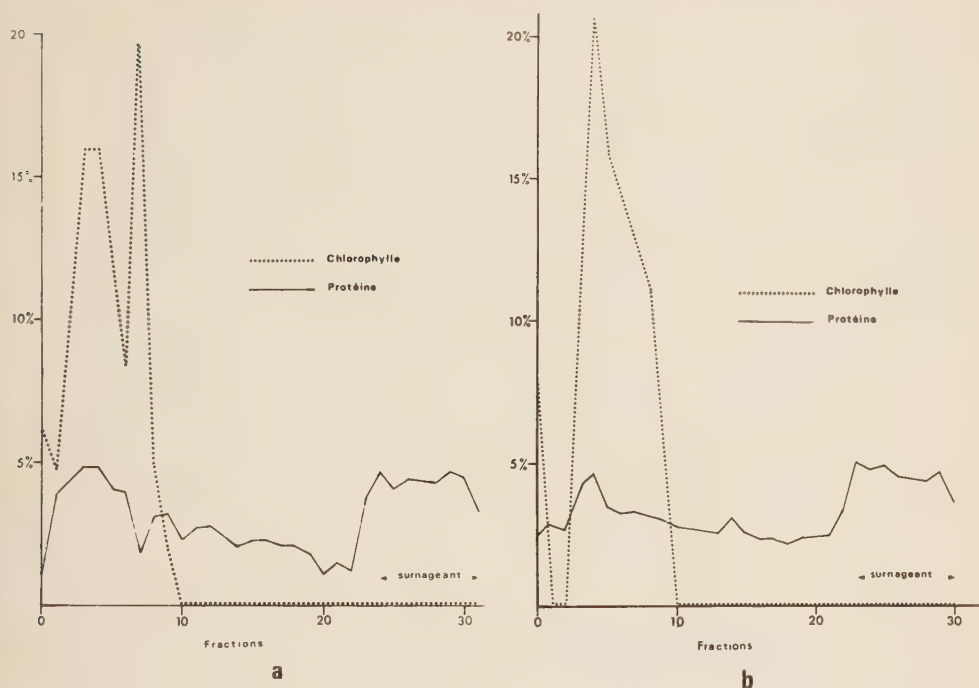


FIG. 10. — *G. thurberi*. Distribution de la chlorophylle et de la protéine dans un gradient de densité.
a) plantes témoins. b) traitement osmotique.

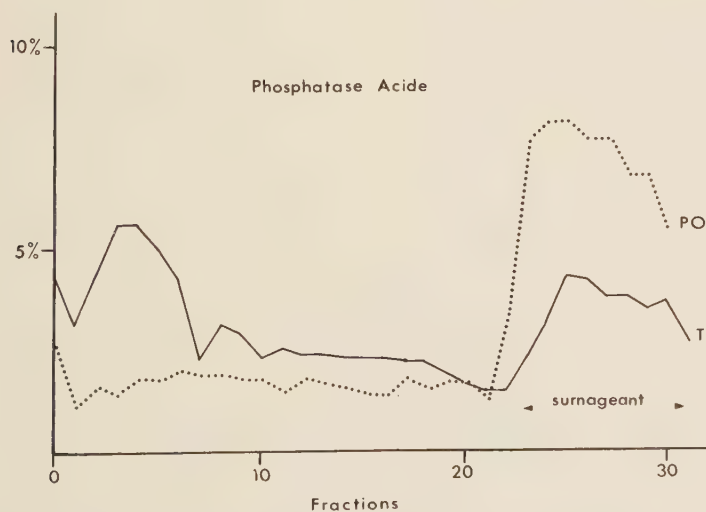


FIG. 11. — *G. thurberi*. Distribution de la phosphatase acide dans un gradient de densité.
PO — Traitement osmotique.
T — Témoin.

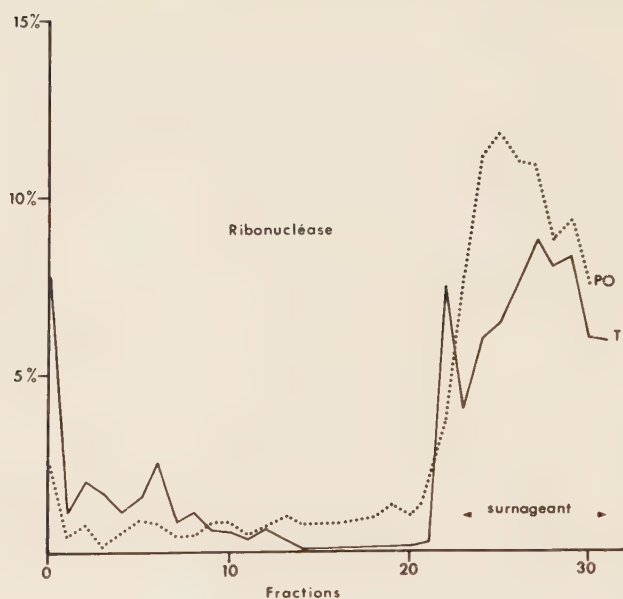


FIG. 12. — *G. thurberi*. Distribution de la ribonucléase acide dans un gradient de densité.
PO — Traitement osmotique.
T — Témoin.

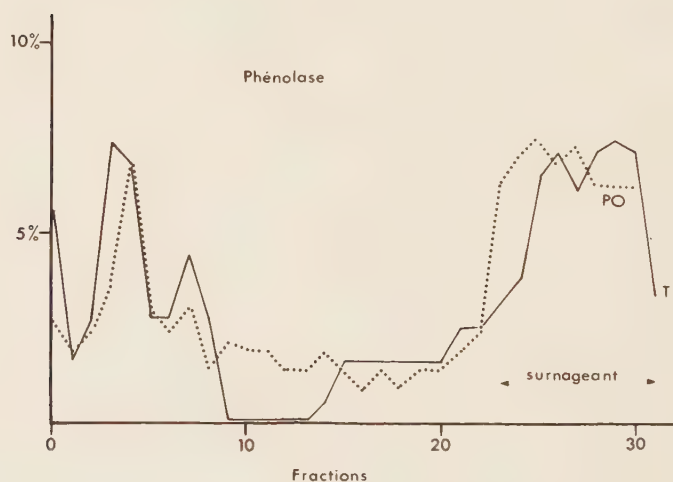


FIG. 13. — *G. thurberi*. Distribution de la O-diphénol oxydase dans un gradient de densité.
PO — Traitement osmotique.
T — Témoin.

protéine. La figure 10 montre que, même dans le témoin, l'intégrité des chloroplastes n'est pas totale, ce qui doit être dû aux manipulations d'extraction.

b) Phosphatase acide. La figure 11 montre que la phosphatase acide est

localisée dans la fraction chloroplastique et qu'elle se solubilise sous l'effet du traitement osmotique.

c) Ribonucléase. Sa distribution (fig. 12) paraît être différente de celle de la phosphatase acide. Elle se localise en partie dans une fraction plus lourde que les chloroplastes, très probablement dans les noyaux et également dans le haut du gradient. Aussi bien l'une que l'autre se solubilisent avec le traitement osmotique.

d) O-diphénol oxydase. Cette enzyme est localisée (fig. 13) dans la fraction chloroplastique contenant encore beaucoup de protéines. Il ne paraît pas y avoir de grandes différences de solubilisation entre le témoin et le traitement osmotique.

En conclusion la distribution de la phosphatase acide et de la ribonucléase ne paraissent pas être identiques, même si leur solubilisation sous l'effet de la sécheresse est semblable.

L'O-diphénol oxydase qui se situe dans la fraction chloroplastique n'accompagne pas la phosphatase acide dans sa solubilisation.

Les chloroplastes perdent des protéines sous l'action de la sécheresse et deviennent plus légers.



FIG. 14. — *G. anomalum*. Distribution de la protéine dans un gradient de densité.

PO — Traitement osmotique.

T — Témoin.

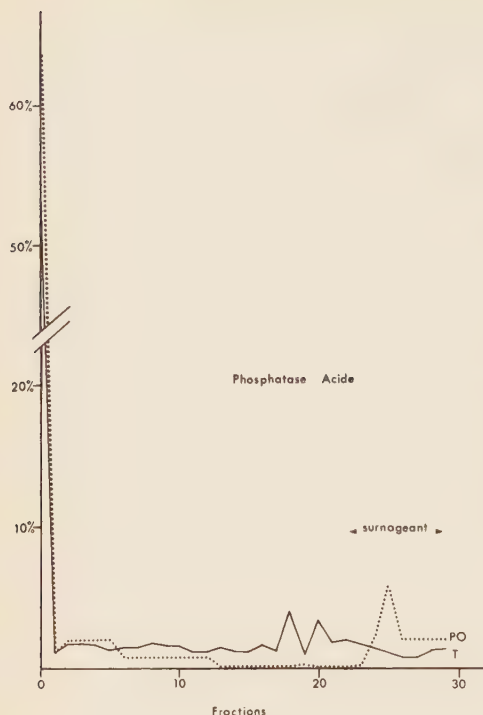


FIG. 15.

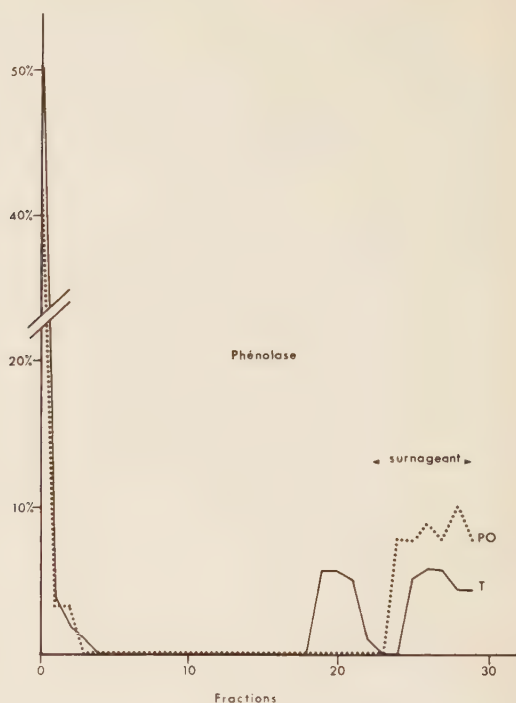


FIG. 16.

FIG. 15. — *G. anomalum*. Distribution de la phosphatase acide dans un gradient de densité.

PO — Traitement osmotique.

T — Témoin.

FIG. 16. — *G. anomalum*. Distribution de la o-diphénol oxydase dans un gradient de densité.

PO — Traitement osmotique.

T — Témoin.

Le même traitement, appliqué à l'espèce résistante *G. anomalum*, a donné les résultats représentés par les figures 14, 15 et 16.

Les chloroplastes, plus lourds que ceux de *G. thurberi*, se trouvent totalement dans le culot, ainsi que la grosse majorité de l'activité de la phosphatase acide et de l'O-diphénol oxydase. Il n'y a pas de différence sensible de solubilisation entre le témoin et le traitement osmotique.

Ceci confirme notre hypothèse suivant laquelle les plantes résistantes à la sécheresse manifestent une plus grande résistance à la solubilisation des enzymes (VIEIRA-DA-SILVA, 1969).

Les fractions riches en chloroplastes, identifiées par la présence de chlorophylle, ne sont certainement pas pures, la difficulté de séparation de fractions non contaminées ayant déjà été soulignée par différents auteurs dont les travaux sont passés en revue par HALLAWAY (1965). Les fractions chloroplastiques peuvent être surtout contaminées par des noyaux, mitochondries et débris de membranes. Les séparations en gradient de densité doivent cependant conduire à une contamination relativement basse. Néanmoins la possibilité d'agglutination de particules

légères n'est pas à exclure entièrement, bien que la composition du milieu de broyage et la faible pression osmotique du gradient ne les favorisent pas.

La localisation chloroplastique de la phosphatase acide présente des problèmes curieux.

Les travaux de RAGETLI *et al.* (1966) paraîtraient démontrer une localisation particulière de cet enzyme à l'intérieur même des chloroplastes, et dans certains de nos gradients il apparaît, après traitement osmotique, un pic de particules légères, contenant de la phosphatase acide (fig. 17).

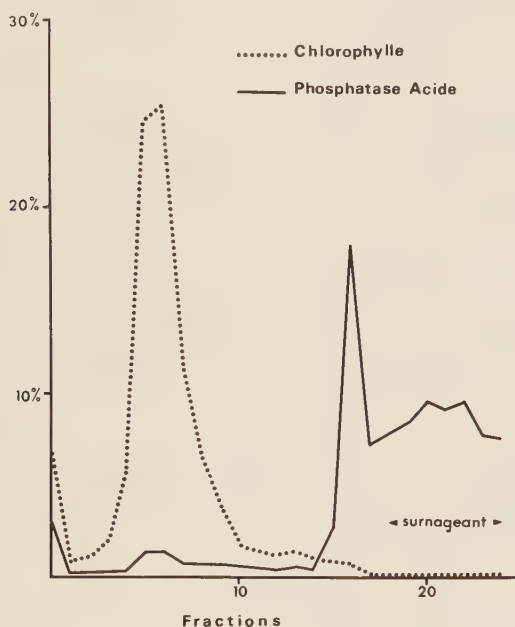


FIG. 17. — *G. thurberi*. Distribution de la phosphatase acide et de la chlorophylle dans un gradient de densité. Plantes soumises à un traitement osmotique.

Ces particules, que nous n'avons jamais trouvées dans les témoins, bien qu'une bande microsomale soit bien visible dans les tubes avant le fractionnement, pourraient avoir pour origine les chloroplastes. Ce phénomène nous rappelle la perte de ribosomes chloroplastiques en conditions d'hypertonie décrite par FILIPPOVICH *et al.* (1967), le même résultat étant retrouvé chez des plantes ayant reçu un choc osmotique (B. MARIN, communication privée).

Il paraît donc que la sécheresse affecterait considérablement les structures chloroplastiques, ce qui permettrait la révélation des enzymes étudiées et confirmerait les prévisions de MAXIMOV et ILJIN déjà citées. A l'appui de ce point de vue TREBST et WAGNER (1962) ont constaté la révélation de l'O-diphénol oxydase par destruction de la structure lipidique des chloroplastes.

Par ailleurs BARTON (1966) et BUTLER (1967) ont montré une lyse des thylakoïdes autour des globules lipidiques des chloroplastes, globules déjà décrits par plusieurs auteurs (BAILEY et WHYBORN, 1963; GREENWOOD *et al.*, 1963;

CAMEFORT, 1964; LAETSCH et *al.*, 1966; LICHTENTHALER et SPREY, 1966) et dont l'importance augmente avec la sénescence des tissus foliaires.

Même s'il n'y a pas d'autres évidence d'activité enzymatique dans ces *plastoglobuli* (LEECH, 1968), il n'en reste pas moins que la ressemblance de ces globules avec les sphérosomes cytoplasmiques, qui se chargent aussi de lipides au stade final de son évolution (DANGEARD, 1919; FREY-WYSSLING et *al.*, 1963) est frappante. Ces globules pourraient donc constituer l'étape ultime de structures lysosomales propres aux chloroplastes. Toutefois les éléments à l'appui de cette hypothèse sont encore très réduits.

La solubilisation des hydrolases par la sécheresse, que nous venons de démontrer, pourrait avoir un effet néfaste sur l'appareil photosynthétique (BAMBERGER et PARK, 1966; CONSTANTOPOULOS et KENYON, 1968).

Certains auteurs, comme MATILE (1969), ont avancé l'hypothèse d'une localisation vacuolaire de la phosphatase acide, localisation qu'il n'était pas possible de distinguer dans les gradients étudiés par nous, car les vacuoles et particules contenant les lipides ne sédimentent pas, et se retrouvent avec le surnageant. Nous avons donc voulu extraire le contenu vacuolaire par pression et mesurer l'activité de la phosphatase acide ainsi récupérée.

Dans une presse hydraulique, nous avons soumis à la pression de $1\ 200\text{ kg cm}^{-2}$ soixante disques de 2,5 cm de diamètre de la quatrième feuille de *G. thurberi*, empilés régulièrement à l'intérieur du cylindre. Après une première extraction, le résidu a été congelé et décongelé et une seconde extraction effectuée. Le résidu de ces deux extractions était broyé et complété à 25 ml. Dans les trois fractions ainsi obtenues on a dosé les protéines et la phosphatase acide.

Le tableau III montre que presque 30 % de l'eau cellulaire, obtenue après deux extractions ne contient qu'environ 1 % de l'activité totale de la phosphatase. Le contenu vacuolaire ne doit donc pas contribuer de façon significative à l'activité phosphatasique de la cellule.

TABLEAU III
Extraction du jus cellulaire par pression à $1\ 200\text{ kg cm}^{-2}$.

	% du total dans la cellule		
	Activité de la phosphatase	Protéine	H ₂ O
1 ^{ère} extraction	0,18	1,78	7,65
2 ^{ème} extraction après congélation	1,07	7,05	22,11
Résidu	98,75	91,17	70,24

Les résultats obtenus paraissent démontrer, comme l'avaient observé YIN (1945), RAGETLI et *al.* (1966), NIR et POLJAKOFF-MAYBER (1966), RAGETLI (1967), qu'une fraction importante de la phosphatase acide de la cellule végétale se trouve dans les chloroplastes.

La courbe de solubilisation de cet enzyme en fonction de l'hydratation de la feuille permet d'imaginer deux compartiments, dans l'un les enzymes se solubilisant

assez facilement et dans l'autre plus lentement, au fur et à mesure que les tissus foliaires se dessèchent. Il paraît logique d'assimiler ce second compartiment aux chloroplastes.

AUGMENTATION DE L'ACTIVITÉ TOTALE.

Nous avons vu dans certaines expériences précédentes que, dans les variétés sensibles à la sécheresse, il y avait non seulement une solubilisation des enzymes hydrolytiques mais aussi une augmentation de l'activité totale de la phosphatase acide ou de la ribonucléase.

Cette augmentation d'activité peut être due à deux causes fondamentales : ou bien l'enzyme existante pouvait se trouver sous une forme moléculaire inactive et c'est l'activation du zymogène qui serait la cause de l'augmentation de l'activité ou bien l'enzyme pouvait être révélée, ou bien la disparition d'inhibiteurs, ou encore, il s'agit de synthèse *de novo*.

Dans tous ces cas l'enzyme révélée ou synthétisée peut être identique à celle qui avait été solubilisée par la sécheresse, soit avoir une forme moléculaire différente (un ou plusieurs isozymes).

Pour essayer d'éclaircir cette question, nous avons étudié l'influence d'inhibiteurs de synthèse des protéines et de l'ARN sur l'activité de la phosphatase acide, de la ribonucléase et de la β -fructofuranosidase dans des disques de feuilles de Cotonnier.

Dans un premier essai, portant sur la phosphatase acide, 20 disques de 0,8 cm de diamètre de la 4^e feuille de *G. hirsutum*, var. HAR 444.2 et var. ATH 555.7 et de *G. arboreum*, ont été infiltrés sous vide pendant 15 minutes soit par une solution de chloramphénicol (4 mg/ml), soit par une solution de D-actinomycine (100 μ g/ml), soit par de l'eau (témoin).

Les disques ont été déposés sur des solutions de PEG 600 de — 10 j. mole⁻¹ de potentiel osmotique. Les essais sur *G. hirsutum* étaient répétés 4 fois, ceux sur *G. arboreum* deux fois.

Après douze heures, les disques sont homogénéisés, traités avec du Triton X-100 pour solubiliser toute la phosphatase latente, centrifugés à 36 000 g pendant 15 minutes et la phosphatase dosée sur le surnageant.

Le tableau IV rend compte des résultats obtenus, l'activité étant exprimée en pourcentage du témoin.

Une deuxième expérience, portant sur l'espèce *G. thurberi* a été exécutée après infiltrations des disques par du chloramphénicol (4 mg/ml), de la cycloheximide (actidione) (10 μ g/ml) ou de l'eau (témoin). Le traitement osmotique des disques a été le même que dans le premier essai et le surnageant a servi à doser la phosphatase acide (sur huit répétitions), la ribonucléase (sur quatre répétitions) et l'invertase (sur quatre répétitions). Le tableau V rapporte les résultats obtenus.

Ces résultats montrent que ni la D-actinomycine ni la cycloheximide ne paraissent avoir d'action, aux doses utilisées, sur l'activité totale de la phosphatase acide. Par contre, le chloramphénicol réduit d'à peu près trente pour cent cette activité dans toutes les espèces essayées.

TABLEAU IV

Activité de la phosphatase acide (en pourcentage du témoin), dans des disques de feuilles de trois variétés de cotonnier soumis à un traitement osmotique et traités par un inhibiteur de la synthèse protéique et par un inhibiteur de la synthèse de l'ARN.

	<i>G. hirsutum</i> HAR 444.2	<i>G. hirsutum</i> ATH 555.7	<i>G. arboreum</i>
Chloramphénicol 4 mg/ml	68,1	68,8	65,2
D - actinomycine 100 µg/ml	98,4	96,6	97,0
Témoin, H ₂ O	100,0	100,0	100,0

TABLEAU V

Activité de la phosphatase acide, de la RNase et de l'invertase (en pourcentage du témoin), dans des disques de feuilles soumis à un traitement osmotique et traités préalablement par un inhibiteur de la synthèse protéique.

	Phosphatase acide	Ribonucléase	Invertase
Chloramphénicol 4 mg/ml	74,0	45,4	127,3
Cycloheximide 10 µg/ml	105,8	104,6	24,9
Témoin, H ₂ O	100,0	100,0	100,0

Le chloramphénicol réduit aussi de moitié l'activité de la ribonucléase, mais il augmente même l'activité de la β -fructofuranosidase qui est cependant inhibée de 75 % par la cycloheximide.

L'interprétation de l'action des inhibiteurs sur la synthèse enzymatique est assez difficile. En effet, il risque d'y avoir parfois des effets secondaires importants. C'est le cas des inhibiteurs qu'on utilise à très fortes doses comme le chloramphénicol. Ce dernier interfère dans la chaîne respiratoire (FREEMAN et HALDAR, 1968) ce qui peut avoir des conséquences sur la synthèse protéique. D'autre part, la baisse de l'activité enzymatique sous l'effet des inhibiteurs n'est pas la preuve que c'est la synthèse *de novo* de la protéine enzymatique qui en est la cause. La synthèse inhibée peut être celle d'une autre protéine nécessaire à l'activation d'un zymogène.

Cependant, les conclusions suivantes paraissent pouvoir être tirées : le manque d'action de la D-actinomycine semble démontrer qu'une synthèse préalable d'ARN n'est pas nécessaire à l'augmentation d'activité totale de la phosphatase acide chez le *G. hirsutum* et le *G. arboreum* (Tableau IV); par contre, les diminutions d'activité de la phosphatase acide, par l'action du chloramphénicol dans ces deux espèces et dans le *G. thurberi* (tableaux IV et V) sont de l'ordre de grandeur, quoiqu'un peu inférieures, des augmentations d'activité totale obtenues sous l'action de la sécheresse (VIEIRA-DA-SILVA, 1969 et fig. 4). Pour l'activité

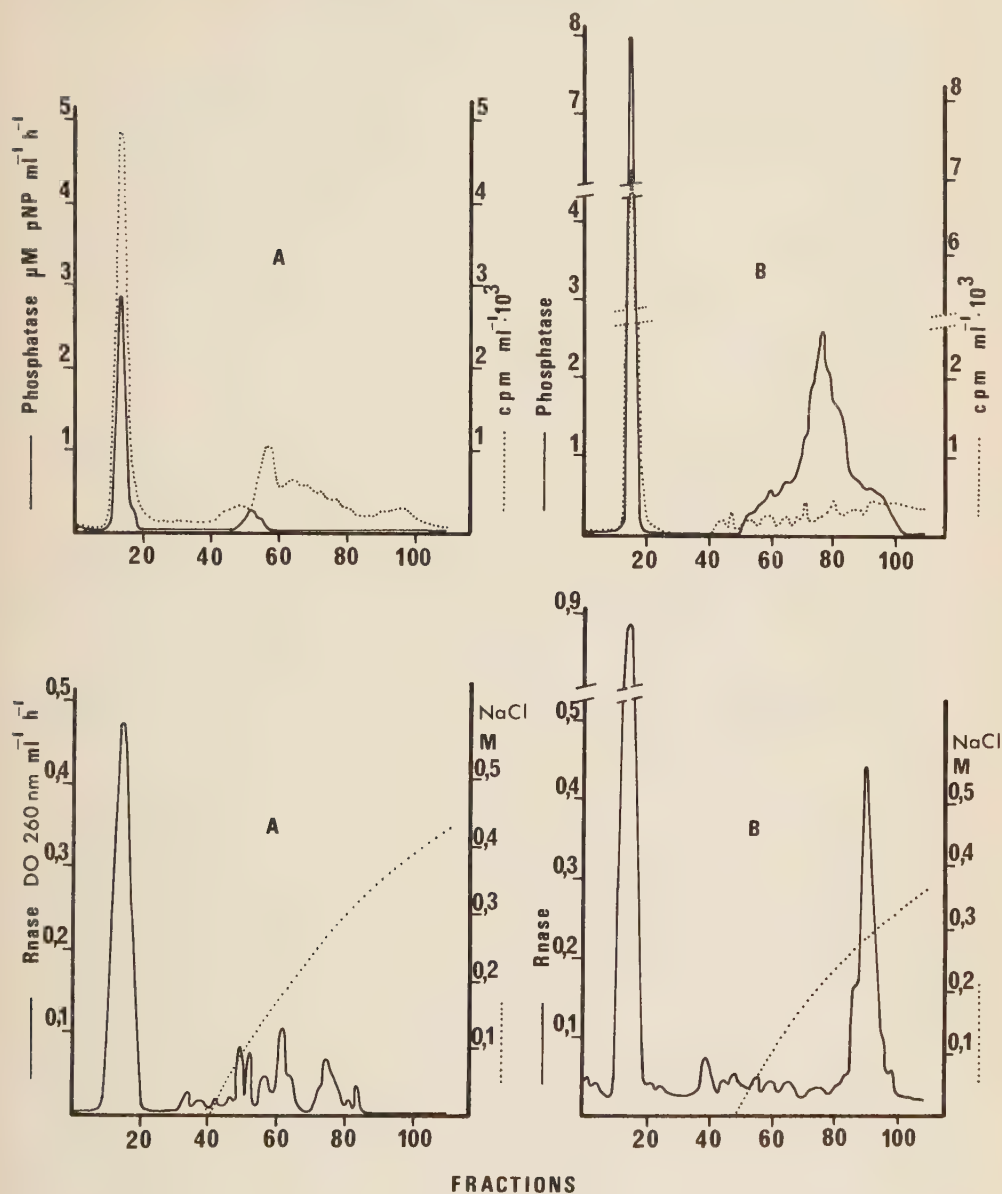


FIG. 18. — Chromatographie sur DEAE-cellulose. *G. thurberi*.

A) plantes témoins, B) plantes ayant reçu un traitement osmotique de -20 j.mole^{-1} pendant 48 h.

En haut, en trait continu, l'activité phosphatasique ; en pointillé ; la radioactivité.

En bas, en trait continu, l'activité ribonucléasique ; en pointillé, le gradient de NaCl utilisé pour l'élution.

ribonucléasique, chez *G. thurberi*, l'inhibition est aussi du même ordre de grandeur que l'augmentation due à la sécheresse (fig. 4). Le manque d'inhibition de l'activité de ces deux enzymes par la cycloheximide pose le problème du système ribosomal responsable de la synthèse.

En effet, la cycloheximide est considérée comme un inhibiteur spécifique de la synthèse des protéines par les ribosomes cytoplasmiques 80 S chez les plantes supérieures (CLARCK et CHANG, 1965; ELLIS et MAC DONALD, 1967). Cette substance a inhibé considérablement l'activité de l'invertase dont la synthèse doit dépendre donc du système ribosomal cytoplasmique. Le chloramphénicol étant un inhibiteur puissant de la synthèse protéique par les ribosomes 70 S chloroplastiques (LINNANE et STEWART, 1967; ELLIS, 1968, 1969), on peut conclure que la synthèse protéique, responsable par l'augmentation d'activité de la phosphatase acide et de la ribonucléase, dépend de ce système ribosomal.

Pour confirmer le caractère de synthèse *de novo* de l'activité phosphatasique et ribonucléasique, nous avons réalisé des essais de marquage.

Dans ces essais deux lots de plantes de *G. thurberi* âgées de trois mois ont été choisis : l'un conservé comme témoin recevant la solution nutritive normale, l'autre traité par une solution nutritive à potentiel osmotique de -20 j. mole⁻¹ pendant 24 heures.

Le marquage des protéines avec la L-leucine (U) ¹⁴C et la chromatographie sur DEAE-cellulose ont été pratiqués selon les procédés indiqués dans le chapitre des techniques, l'acide aminé est appliqué au moment du traitement osmotique simultanément dans les plantes traitées et dans les témoins.

Après chromatographie des extraits de protéine foliaire, il a été déterminé, dans chaque fraction récoltée, de 5 ml, la quantité des protéines, la radioactivité et les activités phosphatase acide et ribonucléase.

Dans tous les essais, nous avons obtenu la même distribution qui est illustrée dans la figure 18.

Il est possible de voir sur cette figure que les plantes témoins donnent un seul pic correspondant à la ribonucléase et à la phosphatase acide. Ces enzymes ne sont pas retenues par le DEAE cellulose. Par contre, chez les plantes ayant subi un traitement osmotique, deux nouveaux pics un de phosphatase acide et l'autre de ribonucléase apparaissent, qui, cependant, ne présentent pas de radioactivité.

Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'activité totale de la ribonucléase et de la phosphatase acide, qui doit correspondre à ces deux nouveaux pics, n'est pas due à une synthèse *de novo*. Ceci est en contradiction avec les conclusions de YOUNG et VARNER (1959) concernant la phosphatase des cotylédons de germinations de Pois; DE BAGI et FARKAS (1966) se rapportant à la ribonucléase dans les feuilles de Tabac endommagées mécaniquement, et de McHALE et DOVE (1968) qui ont étudié la ribonucléase de feuilles sénescents de Tomate.

Par contre, PRESLEY et FOWDEN (1965) utilisant l'acide azétidine-2-carboxylique, analogue de la proline, avaient conclu que l'augmentation de l'activité de la phosphatase acide dans des germinations de plusieurs espèces ne correspondait pas à une synthèse *de novo* mais provenait de la révélation d'un zymogène.

Seul le marquage de la protéine enzymatique suivi de sa purification aurait pu démontrer sans ambiguïté (FILNER et *al.*, 1969) que l'enzyme est néoformée.

Nos expériences n'ont pas pu apporter cette confirmation et, par conséquent, tout au moins pour les nouvelles formes séparées par chromatographie, nous penchons vers l'hypothèse de révélation de zymogènes.

Le métabolisme protéique est associé à l'adaptation des plantes aux changements de milieu. Ainsi McCOWN et *al.*, 1968, 1969) de même que STUTTE et TODD (1969) ont montré, par électrophorèse, l'apparition de nouvelles bandes de peroxidase respectivement avec l'endurcissement au froid ou sous l'action de la sécheresse.

La même influence du milieu paraît se retrouver dans le cas de nouvelles formes de phosphatase acide et de ribonucléase dans le Cotonnier soumis à la sécheresse.

CONCLUSIONS

L'activité de la catalase et de certaines hydrolases augmente sous l'effet de la sécheresse.

L'activité accrue de ces dernières enzymes permet d'expliquer la sénescence accélérée des tissus foliaires. Cette augmentation est due, en partie, à la solubilisation des enzymes latentes et en partie à la révélation de zymogènes.

L'espèce la plus résistante à la sécheresse *G. anomalum* est celle qui est caractérisée par une solubilisation plus réduite de la phosphatase acide. Chez les variétés sensibles, la solubilisation de cette enzyme dépend de l'hydratation relative des feuilles. Par contre, la solubilisation de l'invertase paraît être élevée aussi bien dans les variétés sensibles que résistantes.

Une partie très importante de l'activité latente des enzymes hydrolytiques étudiées, aussi bien que de l'O-diphénol oxydase, se trouve dans la fraction chloroplastique. La sécheresse a comme conséquence une diminution de la quantité de protéines dans cette fraction et une solubilisation de ces enzymes. Ceci pourrait expliquer l'action de la sécheresse sur l'appareil chloroplastique.

Le marquage avec la leucine (U) ^{14}C ne permet pas d'admettre que l'augmentation de l'activité totale soit due à une synthèse *de novo*. Cependant, les études avec le chloramphénicol paraissent démontrer qu'une synthèse protéique est nécessaire pour la révélation de formes inactives de l'enzyme.

L'enzyme révélée sous l'influence du dessèchement paraît être constituée par une ou plusieurs identités moléculaires différentes, isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose (ribonucléase et phosphatase acide).

BIBLIOGRAPHIE

- APPLEGATE G. H., 1960. — Freezing-point depressions of Hoagland's « carbowax » systems. *Nature*, **186**, 232-233.
- ARNON D. I., 1949. — Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.

- ASHWELL G., 1957. — Colorimetric analysis of sugars. In, *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick et N. O. Kaplan ed., vol. III, 85-86.
- AYAD S.R., BONSALE R.W. et HUNT S., 1968. — A simple method for the production of accurate linear gradients using a constant-speed peristaltic pump. *Anal. Biochem.*, **22**, 533-535.
- BAGI G. et FARKAS G.L., 1967. — On the nature of increase in ribonuclease activity in mechanically damaged tobacco leaf tissues. *Phytochemistry*, **6**, 161-169.
- BAILEY J.L. et WHYBORN A.G., 1963. — The osmophilic globules of chloroplasts. II. Globules of the spinach-beet chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 163-174.
- BALZ H.P., 1966. — Intrazelluläre lokalisation und funktion von hydrolytischen enzyemen bei tabak. *Planta* (Berl.), **70**, 207-236.
- BAMBERGER, E.S. et PARK R.B., 1966. — Effect of hydrolytic enzymes on the photosynthetic efficiencies and morphology of chloroplasts. *Plant Physiol.*, **41**, 1591-1600.
- BARTON R., 1966. — Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of *Phaseolus*. *Planta* (Berl.), **71**, 314-325.
- BEAUFAY H., JACQUES P., BEAUDHUIN P., SELLINGER O.Z., BERTHET J. et DE DUVE C., 1964. — Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.*, **92**, 184-205.
- BERNFELD P., 1955. — Amylases, α and β . In, *Methods in Enzymology*, S.P. Colowick et N.O. Kaplan ed., vol. I, 149-150.
- BIELORAI H., 1968. — Estimation of the osmotic potential of citrus seedling leaf sap at different soil-moisture levels by means of refractometry and conductimetry. *Ann. Bot.*, **32**, 473-477.
- BRANDES D. et BERTINI F., 1964. — Role of golgi apparatus in the formation of cytolysomes. *Exper. Cell Res.*, **35**, 194-217.
- BRAUD M., 1967. — La nutrition minérale du cotonnier en culture sans sol. *Coton et Fibr. Trop.*, **22**, 339-356.
- BUNZEL H.H., 1914. — A simplified and inexpensive oxidase apparatus. *J. biol. Chem.*, **17**, 409.
- BUTLER R.D., 1967. — The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. *J. exper. Bot.*, **18**, 535-543.
- CAMEFORT H., 1964. — Evolution de la structure des plastes pendant la maturation de l'arille de l'If (*Taxus baccata* L.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **258**, 1017-1020.
- CHEVALIER A., 1933. — Le *Gossypium anomalum* Wawra et Peyr est-il un cotonnier ou un Cienfuegosia ? *Rev. gen. Bot. App. Agr. Trop.*, **13**, 190-195.
- CLARK J.M.Jr. et CHANG A.Y., 1965. — Inhibitors of the transfer of amino acids from aminoacyl soluble ribonucleic acid to proteins. *J. biol. Chem.*, **240**, 4734-4739.
- CLELAND W.W., 1964. — Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, **3**, 480-482.
- CONSTANTOPOULOS G. et KENYON C.N., 1968. — Release of free fatty acids and loss of Hill activity by aging spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **43**, 531-536.
- CORBETT J.R. et PRICE C.A., 1967. — Intracellular distribution of p-nitrophenyl-phosphatase in Plants. *Plant Physiol.*, **42**, 827-830.
- COUPER A. et ELEY D.D., 1948. — Surface tension of polyoxyethylene glycol solutions. *J. polymer. Sci.*, **3**, 345-349.
- CRAFTS A.S., CURRIER H.B. et STROCKING C.R., 1949. — *Water in the physiology of plants*. Waltham, Mass. Chronica Botanica Co.
- DAINTY, J., 1963. — Water relations of plant cells. *Adv. bot. Res.*, **1**, 279-326.
- DANGEARD P.A., 1919. — Cytologie. Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **169**, 1005-1010.
- DE DUVE C. et BAUDHUIN P., 1966. — Peroxisomes (Microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, **46**, 323-357.

- DE DUVE C., BERTHET J. et BEAUFAY H., 1959. — Gradient centrifugation of cell particles. Theory and applications. *Progress in Biophys. biophysical Chem.*, **9**, 325-369.
- DE DUVE C. et WATTIAUX R., 1966. — Functions of Lysosomes. *Ann. Rev. Phys.*, **28**, 435-492.
- DOVE L.D., 1967. — Ribonuclease activity of stressed tomato leaflets. *Plant Physiol.*, **42**, 1176-1178, 1967.
- ELLIS R.J., 1968. — Stereospecificity of chloramphenicol inhibition of chloroplast ribosomes. *Biochem. J.*, **110**, 42.
- ELLIS R.J., 1969. — Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. *Science*, **163**, 477-478.
- ELLIS R.J. et McDONALD I.R., 1967. — Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet disks. *Plant Physiol.*, **42**, 1297-1302.
- FARKAS G.L. et RAJHATHY T., 1955. — Untersuchungen über die xeromorphischen Gradienten einiger Kulturpflanzen. *Planta* (Berl.), **45**, 535-548.
- FILIPPOVICH I.I., SPANDAR'YAN O.A., SVETILO E.N. et SISAKYAN N.M., 1967. — State of ribosomes in chloroplasts. *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **172**, 1214-1217 (traduction anglaise).
- FILNER P., WRAY J.L. et VARNER J.E., 1969. — Enzyme induction in higher plants. *Science*, **165**, 358-367.
- FREDERICK S.E. et NEWCOMB E.H., 1969. — Microbody-like organelles in leaf cells. *Science*, **163**, 1352-1355.
- FREEMAN K.B. et HALDAR D., 1968. — The inhibition of mammalian mitochondrial NADH oxydation by chloramphenicol and its isomers and analogues. *Canad. J. Biochem.*, **46**, 1003-1008.
- FREY-WYSSLING V.A., 1965. — Vergleichende Organellographie. *Experientia*, **21**, 681-744.
- FREY-WYSSLING A., GRIESHABER E. et MÜHLETHALER K., 1963. — Origine of spherosomes in plant cells. *J. Ultrastr. Res.*, **8**, 506-516.
- FREYXELL P.A., 1968. — A redefinition of the Tribe *Gossypieae*. *Bot. Gaz.*, **129**, 296-308.
- GAHAN P.B., 1965. — Histochemical evidence for the presence of Lysosome like particles in root meristem cells of *Vicia faba*. *J. exper. Bot.*, **16**, 350-355.
- GATES C.T. et BONNER J., 1959. — The response of the young tomato plant to a brief period of water shortage. IV. Effects of water stress on the ribonucleic acid metabolism of tomato leaves. *Plant Physiol.*, **34**, 49-55.
- GOOD N.E., WINGET G.D., WINTER W. et CONOLLY T.N., 1966. — Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, **5**, 467-477.
- GREENWAY H. et HILLER R.G., 1967. — Effects of low water potentials on respiration and on glucose and acetate uptake by *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta* (Berl.), **75**, 253-274.
- GREENWAY H., HILLER R.G. et FLOWERS T., 1968. — Respiratory inhibition in chlorella produced by "Purified" Polythylene Glycol 1540. *Science*, **159**, 984-985.
- GREENWOOD A.D., LEECH R.M. et WILLIAMS J.P., 1963. — The osmiophilic globules as a normal component of chloroplasts and their isolation and composition in *Vicia faba* L. *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 148-162.
- HADZIYEV D., MEHTA S.L. et ZALIK S., 1969. — Nucleic acid and ribonucleases of wheat leaves and chloroplasts. *Canad. J. Biochem.*, **47**, 273-282.
- HALLAWAY M., 1965. — The localisation of biochemical activities in the cells of higher plants. *Biol. Rev.*, **40**, 188-230.
- HEWITT E.J., 1952. — *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks.
- HEWLETT J.D. et KRAMER P.J., 1963. — The measurement of water deficits in broadleaf plants. *Protoplasma*, **57**, 381-391.
- ILJIN W.S., 1935. — Die Lebensfähigkeit der Pflanzenzellen in trockenem Zustand. *Planta* (Berl.), **24**, 742-754.
- ILJIN W.S., 1953. — Causes of death of plants as a consequence of loss of water: conservation of life in desiccated tissues. *Bull. Torrey bot. Cl.*, **80**, 166-177.

- JACKS T.J. et YATSU L.Y., 1967. — Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds. *Feder. Proc.*, **26**, 454.
- JACKS T.J., YATSU L.Y. et ALTSCHUL A.M., 1967. — Isolation and characterization of Peanut spherosomes. *Plant Physiol.*, **42**, 585-597.
- JANES B.E., 1966. — Adjustment mechanisms of plants subjected to varied osmotic pressures of nutrient solution. *Soil Sci.*, **101**, 180-188.
- JANES B.E., 1961. — Use of polyethylene glycol solvent to increase the osmotic pressure of nutrient solutions in studies on the physiology of water in plants. *Plant Physiol.*, **36**, xxiv.
- JARVIS P.G. et JARVIS M.S., 1963. — The water relations of tree seedlings. IV. Some aspects of the tissues water relations and drought resistance. *Physiol. Plant*, **16**, 501-516.
- KAMAT V.B. et WALLACH D.F.H., 1965. — Separation and partial purification of plasma-membrane fragments from Ehrlich ascites carcinoma microsomes. *Science*, **148**, 1343-1345.
- KESSLER B., 1959. — Nucleic acids as factors in drought resistance of higher plants. *Recent. Adv. Botany*, IX Internat. Bot. Congress Montreal 1959, **2**, 1153-1159.
- KISAKI T. et TOLBERT N.E., 1969. — Glycolate and glyoxylate metabolism by isolated peroxisomes or chloroplasts. *Plant Physiol.*, **44**, 242-250.
- KURSANOV A.L., 1940. — (*L'effet reversible des enzymes dans la cellule végétale vivante*). Moscou et Leningrad, Acad. Sci. (en russe).
- KURSANOV A.L., 1946. — (*L'adsorption des enzymes par les tissus des plantes supérieures*). *Biohimija*, **11**, 333-348 (en russe).
- LAETSCH W.M., STEITLER D.A. et VLITOS A., 1966. — The ultrastructure of sugar cane chloroplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, **54**, 472-474.
- LAGERWERFF J.V., OGATA G. et EAGLE H.E., 1961. — Control of osmotic pressure of culture solutions with Polyethylene Glycol. *Science*, **133**, 1486-1487.
- LEECH R.M., 1968. — The chloroplast inside and outside the cell. In, *Plant Cell Organelles*. J.B. Pridham ed., 137-162.
- LICHTENTHALER H.K. et SPREY B., 1966. — Über die osmiophilen globulären lipidienschlüsse der Chloroplasten. *Z. Naturforsch.*, **21b**, 690-697.
- LINHART K. et WALTER K., 1963. — Phosphatases : determination in serum with p-nitrophenyl phosphate. In, *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer ed., Academic Press. New York, 783-785.
- LINNANE A.W. et STEWART P.R., 1967. — The inhibition of Chlorophyll formation in *Euglena* by antibiotics with inhibit bacterial mitochondrial protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 511-516.
- LOOMIS W.D. et BATTAILE J., 1968. — Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, **5**, 423-438.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARRAL A.L. et RANDALL R.J., 1951. — Protein measurements with the Folin phenol reagents. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MACH O. et LACKO L., 1968. — Density gradient in a Dextran Medium. *Anal. Biochem.*, **22**, 393-397.
- MACKLON A.E.S. et WEATHERLEY P.E., 1965a. — A vapour-pressure instrument for the measurement of leaf and soil water potential. *J. exper. Bot.*, **16**, 261-270.
- MACKLON A.E.S. et WEATHERLEY P.E., 1965b. — Controlled environment studies of the nature and origins of water deficiency in plants. *New Phytol.*, **64**, 414-427.
- MATILE Ph., 1966. — Enzyme der Vakuolen aus Wurzelzellen von Maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung der Vakuole bei der intrazellulären Verdauung. *Z. Naturforsch.*, **21b**, 871-878.
- MATILE Ph., 1968a. — Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. *Planta (Berl.)*, **79**, 181-196.
- MATILE Ph., 1968b. — Aleurone vacuoles as lysosomes. *Z. Pflanzenphysiol.*, **58**, 365-368.
- MATILE Ph., 1969. — Vacuoles as lysosomes of plant cells. *Biochem. J.*, **111**, 26 p.

- MATILE Ph., BALZ J.P., SEMADENI E. et JOST M., 1965. — Isolation of spherosomes with lysosome characteristics from seedlings *Z. Naturforschg*, **20b**, 693-698.
- MATILE Ph. et MOOR H., 1968. — Vacuolation : origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta* (Berl.), **80**, 159-175.
- MATILE Ph. et SPICHTER J., 1968. — Lysosomal enzymes in spherosomes (oil droplets) of tobacco endosperm. *Z. Pflanzenphysiol.*, **58**, 277-280.
- MATILE Ph. et WIEMKEM A., 1967. — The vacuole as the lysosome of the yeast cell. *Arch. Mikrobiol.*, **56**, 148-155.
- MAXIMOV N.A., 1929. — The physiological nature of drought resistance of plants. *Proc. Int. Cong. Plant Sci.*, Ithaca 2, 1169-1175.
- MAXIMOV N.A., 1941. — (L'influence de la sécheresse sur les processus physiologiques des plantes). *Collection de travaux sur la physiologie végétale à la mémoire de K.A. Timiryazev*. Moscou, Acad. Sci. U.R.S.S., 299-309 (en russe).
- MCCLENDEN J.F. et BLINK L., 1952. — Use of high molecular weight solutes in the study of isolated intracellular structures. *Nature*, **170**, 577-578.
- MCCOWN B.H., BECK G.E. et HALL T.C., 1968. — Plant leaf and stem proteins. I. Extraction and electrophoretic separation of the basis, water-soluble fraction. *Plant Physiol.*, **43**, 578-582.
- MCCOWN B.H., HALL T.C. et BECK G.E., 1969. — Plant leaf and stem protein. II. Isozymes and environmental change. *Plant Physiol.*, **44**, 210-216.
- McHALE J.S. et DOVE L.D., 1968. — Ribonuclease activity in tomato leaves as related to development and senescence. *New Phytol.*, **67**, 505-515.
- MOSS D.N., 1968. — Photorespiration and glycolate metabolism in tobacco leaves. *Crop Sci.*, **8**, 71-76.
- MOTHS K., 1956. — Der Einfluss des Wasserzustandes auf Fermentprozes und Stoffumsatz. In, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Band III, W. Ruhland ed., Berlin, Springer, 656-664.
- NELSON E.B., TOLBERT N.E. et HESS J.L., 1969. — Glycolate stimulation of oxygen evolution during photosynthesis. *Plant. Physiol.*, **44**, 55-59.
- NIR I. et POLJAKOFF-MAYBER A., 1966. — The effect of water stress on the activity of Phosphatases from Swiss Chard Chloroplasts. *Israël J. Bot.*, **15**, 12-16.
- OPARINE A.I., 1937. — Richtungsenstellung der Invertasewirkung in der lebenden Pflanzenzelle. *Enzymologia*, **4**, 13-23.
- OPARINE A.I., 1953. — Variations de l'activité des enzymes dans la cellule végétale sous l'effet des facteurs extérieurs. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 67-82.
- OPARINE A.I. et KADEN S.B., 1945. — (La transformation de la beta-amylase dans les graines de blé en germination). *Biohimija*, **10**, 25-36 (en russe).
- OLSZEWSKA M.J., WALEK-CZERNECKA A., KWIATKOWSKA M. et GABARA B., 1965. — Hétérogénéité enzymatique des sphérosomes. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**, 399-401.
- POUX N., 1963a. — Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de blé. (*Triticum vulgare* Vill.). *J. Microscopie*, **2**, 485-489.
- POUX N., 1963b. — Localisation des phosphates et de la phosphatase acide dans les cellules des embryons de blé (*Triticum vulgare* Vill) lors de la germination. *J. Microscopie*, **2**, 557-568.
- POUX N., 1965. — Localisation de l'activité phosphatasique et des phosphatases dans les grains d'aleurone. I. Grains d'aleurone renfermant à la fois globuloïdes et cristalloïdes. *J. Microscopie*, **4**, 771-782.
- PRESLEY H.J. et FOWDEN L., 1965. — Acid phosphatase and isocitritase production during seed germination. *Phytochemistry*, **4**, 169-176.
- PUJARNISCLE S., 1965. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* : analogie avec les lysosomes. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **261**, 2127-2130.
- PUJARNISCLE S., 1966. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* : Distribution de la phosphatase acide, de la β -glucosidase et de la cathépsine dans le latex. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **262**, 923-925.

- PUJARNISCLE S., 1968. — Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Mull Arg. *Physiol. Vég.*, **6**, 27-46.
- PUJARNISCLE S., 1969. — Etudes biochimiques des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, Mull. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. *Thèse Doctorat d'Etat (Sci. nat.)* n° A.O. 3379, Orsay.
- RAGETLI H.W.J., 1967. — Virus host interactions, with emphasis on certain cytopathic phenomena. *Canad. J. Bot.*, **45**, 1221-1234.
- RAGETLI H.W.J., WEINTRAUB M. et RINK U.M., 1966. — Latent acid phosphatase in chloroplasts. *Canad. J. Bot.*, **44**, 1723-1725.
- ROBINSON R.A. et STOKES R.H., 1955. — *Electrolyte solutions*. Butterworths Scientific Publications, London.
- SAUNDERS J.H., 1961. — *The wild species of Gossypium and their evolutionary history*. Oxford University Press, London.
- SCHUCHER R. et HOKIN L.E., 1954. — The synthesis and secretion of lipase and ribonuclease by pigeon pancreas slices. *J. biol. Chem.*, **210**, 551-557.
- SEMADENI E.G., 1967. — Enzymatische Charakterisierung der Lysosomenäquivalente (Sphärosomen) von Maiskeimlingen. *Planta (Berl.)*, **72**, 91-118.
- SLATYER R.O. et TAYLOR S.A., 1960. — Terminology in plant and soil water relations. *Nature*, **187**, 922-924.
- SOROKIN H.P., 1967. — The spherosomes and the reserve fat in plant cells. *Amer. J. Bot.*, **54**, 1008-1016.
- SOROKIN H.P. et SOROKIN S., 1968. — Fluctuations in the acid phosphatase activity of spherosomes in guard cells of *Campanula persicifolia*. *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 791-802.
- SPOEHR H.A. et MILNER H.W., 1939. — Starch dissolution and amylotic activity in leaves. *Proc. Amer. phil. Soc.*, **81**, 37-78.
- STOCKER O., 1961. — *Les effets morphologiques et physiologiques du manque d'eau sur les plantes. Recherches sur la zone aride*. XI. Echanges hydriques des plantes en milieu aride ou semi-aride. Unesco, Paris, 69-113.
- STUTTE C.A. et TODD G.W., 1969. — Some enzyme and protein changes associated with water stress in wheat leaves. *Crop Sci.*, **9**, 510-512.
- THOMSON J.F. et KLIPPEL F.J., 1958. — Fractionation of rat liver particulates using polyvinylpyrrolidone gradients. *Exper. Cell Res.*, **14**, 612-614.
- TOLBERT N.E., OESER A., KISAKI T., HAGEMAN R.H. et YAMAZAKI R.K., 1968. — Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. biol. Chem.*, **243**, 5179-5184.
- TOLBERT N.E., OESER A., YAMAZAKI R.K., HAGEMAN R.H. et KISAKI T., 1969. — A survey of plants for leaf peroxisomes. *Plant Physiol.*, **44**, 135-147.
- TREBST V.A. et WAGNER S., 1962. — Über die Photoxidation von Hydrochinonen und über eine latente Polyphenoloxydase in Chloroplasts. *Z. Naturforsch.* **17b**, 396-400.
- VASSILIEV I.M. et VASSILIEV M.G., 1936. — Changes in carbohydrate content in wheat plant during the process of hardening for drought resistance. *Plant Physiol.*, **11**, 115-125.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1965. — Sur un indice de stabilité de la catalase, utilisable comme critère de sélection pour la tolérance à la sécheresse dans le genre *Gossypium*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **261**, 2709-2711.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1967. — Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre *Gossypium*. I. *Cot. Fib. Trop.*, **22**, 197-204.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1968a. — Influence du potentiel osmotique du milieu de culture sur l'activité de la ribonucléase dans trois espèces de *Gossypium*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **266**, 2412-2415.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1968b. — Le potentiel osmotique du milieu de culture et l'activité soluble et latente de la phosphatase acide dans le *Gossypium thurberi*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **267**, 729-732.

- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1968c. — Influence du potentiel osmotique de la solution nutritive sur la teneur en glucides solubles et amidon de trois espèces de *Gossypium*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **267**, 1289-1292.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B., 1969. — Comparaison entre cinq espèces de *Gossypium* quant à l'activité de la phosphatase acide après un traitement osmotique. Etude de la vitesse de solubilisation et de formation de l'enzyme. *Z. Pflanzenphysiol.*, **60**, 385-387.
- VIEIRA-DA-SILVA J.B. et POISSON Ch., 1969. — Solubilisation d'enzymes hydrolytiques chez *Gossypium hirsutum*, *G. anomalum* et des dérivés de l'hybridation entre ces deux espèces. *Canad. J. Genet. Cyt.*, **11**, 582-586.
- WALEK-CZERNECKA A., 1962. — Mise en évidence de la phosphatase acide (monophospho-estérase II) dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **31**, 541-543.
- WALEK-CZERNECKA A., 1963. — Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **32**, 405-408.
- WALEK-CZERNECKA A., 1965. — Histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in the spherosomes of plant cells. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **34**, 573-588.
- WALTER H. et THREN R., 1934. — Die Berechnung des osmotischen Wertes auf Grund von kryoskopischen Messungen und der Verleich mit Saugkraftbestimmungen. *Jahresb. wiss. Bot.*, **80**, 20-35.
- WHATLEY T.A., 1966. — The vapor pressure osmometer : transport or thermodynamic process ? *Facts Meth. Sci. Res.*, **7**, 10-12.
- YATSU L.Y. et JACKS T.J., 1968. — Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 466-471.
- YIN H.C., 1945. — A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues. *New Phytol.*, **44**, 191-195.
- YOUNG J.L. et VARNER J.E., 1959. — Enzyme synthesis in the cotyledons of germinating seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 71-78.

